

Université de Lille Nord de France
Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE-NORD DE FRANCE

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Par

Gaëlle LENGLET

**Mécanisme d'action de nouveaux agents
alkylants ciblant l'ADN ou les protéines**

Soutenue le 15 décembre 2010 devant le jury :

Rapporteurs : Dr Sophie BOMBARD

Dr Thierry RABILLOUD

Examineurs : Pr Fernando RODRIGUES-LIMA

Pr Pierre FORMSTECHER

Membre invité
(co-Directeur de thèse): Dr Denise MENDY

Directeur de thèse : Dr Marie-Hélène DAVID

A Michaël,

A ma Famille,

A tous ceux qui me sont chers...

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements aux docteurs Sophie BOMBARD et Thierry RABILLOUD d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également les professeurs Fernando RODRIGUES-LIMA et Pierre FORMSTECHE, de me faire l'honneur de siéger dans ce jury.

J'exprime également toute ma reconnaissance à mes tuteurs de thèse les docteurs Marie-Hélène DAVID et Denise MENDY.

Remerciements

Ce projet de thèse fut réalisé au sein de l'équipe 4 de l'unité INSERM 837. Je tiens à remercier le Pr Formstecher d'avoir su m'accorder sa confiance et de m'avoir apporté conseil et soutien.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'Université de Lille 2, le Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais, l'Inserm ainsi que les membres du conseil de l'IRCL, dont le Pr Jean Krembel pour le financement de ma thèse.

Le bon déroulement de la thèse n'aurait pu se faire sans l'assistance, la disponibilité et le professionnalisme de mes deux tutrices. Je remercie très chaleureusement Marie-Hélène David pour m'avoir orienté dans mes travaux de recherche, je lui adresse toute ma gratitude pour son soutien et son aide quand j'en ai eu besoin. Je tiens également à te remercier pour m'avoir permis de participer à différents congrès et projets qui m'ont permis un épanouissement personnel sans précédent. Je remercie le Dr Denise Mendy pour sa transmission de savoir en protéomique et pour ses précieux conseils.

Encore un grand merci pour tout.

Sabine (Depauw), je te remercie pour m'avoir intégré aussi bien professionnellement qu'amicalement, pour ta grande disponibilité, ta gentillesse, ta bonne humeur et tes expériences culinaires que l'on a dû éliminer en faisant du roller et du sport en salle !! Raja (Nhili), je tiens à te remercier pour tes encouragements et ton aide à finaliser ce projet de thèse. Et n'oublions pas Marie-Paule (Hildebrand), j'ai apprécié votre joie de vivre et votre franchise.

Je remercie également les thésards et post-doctorants, Paul Peixoto, Magali Rebusci, Samuel Meignan et Laure Delestré pour leur bonne humeur et leur soutien. Je remercie aussi Xavier Dezziter pour son aide dans mes débuts à la paillasse.

Je tiens à remercier Christelle Vambesien et Odile Viltard grâce à qui j'ai eu l'occasion de m'essayer à l'enseignement durant ces deux dernières années.

Un grand merci aux Amélie Lansiaux et Dewitte, à Nicole Lemahieu (l'as du cytomètre et des discussions politiques), Christine Bal (ma collègue motarde), Brigitte Baldeyrou et Nicolas Simon pour leur soutien durant mes années au laboratoire. Merci également à « l'équipe 4 du troisième », pour leur accueil, merci au Dr Renata Polakowska et à Yasmine Touil pour leurs conseils.

Remerciement

Je remercie le Dr Maud Collyn, pour sa joie de vivre et la mise à disposition du matériel de l'IMPRT IFR-114. Nathalie et Meryem, je vous remercie pour votre gentillesse et pour votre apprentissage au bon usage des machines.

Hervé Drobecq, je te remercie pour ta collaboration, et oui je dois être une rare personne des alentours à être contente d'identifier de la GAPDH !! Un grand merci également au Dr Florence Pinet pour m'avoir permis d'utiliser l'Ettan-DIGE Imager et à Olivia Beseme pour l'aide donné concernât son utilisation

Je remercie tous mes collègues organisateurs des Journées André Verbert, pour ces bons moments passés lors de nos réunions, notamment notre directrice le Dr Malika Hamdane pour ses nombreux conseils prodigués.

Je remercie le Pr Jean-Louis Kraus pour l'étude du produit JLK1486.

Je remercie Micheline Magdelon pour son efficacité, sa gentillesse et Matthias pour son humour. Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la rédaction de ce mémoire et aux membres de la grande famille IRCL, que je ne citerai pas de peur d'oublier quelqu'un.

Au delà des murs du labo, il existe une vie dans laquelle j'ai pu compter sur mon amie Wendeline, son amitié a été le meilleur réconfort lors de ces années d'étude.

Un grand merci à Jean-Jacques et Véronique pour leur gentillesse, leur soutien et de m'avoir accueilli dans leur famille depuis presque dix ans.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance à ma famille. Mes sœurs Mathilde et Noémie pour avoir partagé ma vie durant ce travail, et qui m'ont donné leur force et leur soutien. Mes parents qui m'ont permis de faire ces études, pour les perpétuels encouragements et leur confiance sans lesquels je n'aurais pu réussir.

Merci à toi Michaël qui partage ma vie depuis presque dix ans. Tu m'as accompagné dans toutes mes épreuves depuis les bancs du lycée jusqu'à aujourd'hui. Tu as fais plus de sacrifices que je ne pourrais l'admettre pour supporter mon stress et mon emploi du temps pendant toutes ces années et en particulier pendant mes années de Master puis de Doctorat. Je te remercie d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir écarté les doutes, merci pour ton amour et pour tout le bonheur que tu m'as apporté.

☺Merci à tous!!!

LISTE DES
ABREVIATIONS

Liste des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribo Nucléique
ADNdb:	ADN double brin
ADNsb:	ADN simple brin
AIF :	Apoptosis Inducing Factor
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
AMV-RT :	Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase
ANT:	Adenine Nucleotide Translocator
APE1:	Human APyrimidic/APuric Endonuclease 1
Ap4A :	Diadénine Polyphosphate
ARN:	Acide RiboNucléique
Ara-C:	Cytarabine cytosine arabinoside
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR:	Ataxia telangiectasia mutated-RAD3 related
BER:	Base Exision Repair
3BrPA:	Pyruvic acid analog 3-bromopyruvate
BSO:	Buthionine Sulfoximine
CAST-ing:	Cyclic Amplification of Sequence Targeting
CBP:	CREB Binding Protein
CICD:	Caspase Independante Cell Death
Cyt c:	Cytochrome <i>c</i>
dATP:	Désoxyadenosine triphosphate
dGTP:	Désoxyguanosine triphosphate
dCTP:	Désoxycytosine triphosphate
dTTP:	Désoxythymidine triphosphate
DSBs :	Cassures doubles brins de l'ADN
DMSO :	Diméthyl sulfoxide

Liste des abréviations

DO :	Densité Optique
EI-MS:	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
5-FU:	5-Fluoro-Uracile
GAPDH:	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GG-NER:	Global Genomic Nucleotide Excision Repair
G3P:	Glycéraldéhyde-3-Phosphate
GSH:	Glutathion
GSNO:	Glutathion nitrosylé
GST pull-down:	Glutathione S-Transferase pull-down
γ H2AX:	H2AX phosphorylé
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HIF-1:	Hypoxia inducible factor-1
HMG-B1:	High Mobility Group-B1
4-HNE:	4-hydroxy-2-nonenal
HPV:	Human papillomavirus
HRP:	Horse Radish-Peroxidase
ICL:	Crosslink interbrin
IPSF-II α :	Immunoglobulin Production Stimulating Factor-II α
LDH-B :	Lactate Déshydrogénase B
LMC :	Leucémie Myéloïde Chronique
LPS :	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF:	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight
MGMT :	O6-Méthyl-Guanine DNA Méthyl Transférase
min :	Minute
mL :	Millilitre
mM :	Millimolaire

Liste des abréviations

mm :	Millimètre
MMP :	Perméabilisation de la Membrane Mitochondriale
MMR:	Mismatch Repair
MPG:	Méthylpurine Glycosylase
mU:	Milli-unité
NAD ⁺ :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NER:	Nucleotide Excision Repair
NES:	Nuclear Export Signal
NLS:	Nuclear Localization Signal
ng:	Nanogramme
nm:	Nanomètre
NO:	Oxide Nitrique
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
OEC:	Observatoire Européen du Cancer
PARP:	Poly(ADP-ribose) Polymerase
pb:	Paires de bases
PM:	Poids Moléculaire
PCAF:	P300/CBP-Associated Factor
pI:	Point Isoélectrique
PSF:	Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor
PVDF:	Polyvinylidene fluoride
RE:	Réticulum Endoplasmique
Rpm:	Rotations Par Minute
ROS:	Espèces Réactives de l'Oxygène
siRNA:	Small Interference RNA
SVF:	Sérum de Veau Fœtal
TBP:	TATA Binding Protein

Liste des abréviations

TC-NER:	Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair
TGF- β :	Transforming Growth Factor-beta
T _m :	Melting Temperature
TRAI:	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
U:	Unités
UDG:	Uracile DNA Glycosylase
V:	Volts
XELOX:	Combinaison de l'oxaliplatine (par voie intraveineuse) et de la capecitabine (par voie orale)
μg :	Microgramme
μM :	Micromolaire
μm :	Micromètre
$\Delta\Psi_{\text{mt}}$:	Variation du potentiel de membrane mitochondriale

TABLE DES MATIERES

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	6
TABLE DES MATIERES	11
CHAPITRE I : Introduction	17
1. Cancer et cibles moléculaires	18
1.1. Terminologie et épidémiologie	18
1.2. Tumorigenèse : Dommages à l'ADN	19
1.3. Historique de la chimiothérapie	21
1.4. Phénomènes de résistance	22
1.5. Efficacité du traitement chimiothérapeutique	23
2. Traitement systémique, agents chimiques	23
2.1. Agents ciblant les voies signalétiques	24
2.2. Anti-métabolites	24
2.3. Antitubulines.....	25
2.4. Inhibiteurs de Topoisomérases	25
2.5. Agents intercalants de l'ADN	26
2.6. Agents clivant l'ADN	26
2.7. Agents alkylant l'ADN	26
2.7.1. Définition	26
2.7.2. Agents alkylant le grand sillon.....	28
2.7.3. Alkylants du petit sillon.....	33
3. Le S23906-1	36
3.1. Découverte de l'acronycine et synthèse de dérivés pentacycliques.....	36
3.2. Mécanisme d'action du S23906-1	39
3.2.1. Mécanisme d'action cellulaire du S23906-1	39
3.2.2. Détoxification cellulaire du composé	42
3.2.3. L'ADN comme cible moléculaire du S23906-1.....	43
3.3. Bilan mécanistique	47
3.4. Déstabilisation de la double hélice	48
3.5. Objectifs.....	48
4. GAPDH	49
4.1. Expression et structures de la GAPDH	50
4.1.1. Gène(s) de la GAPDH	50
4.1.2. Régulation de l'expression de la GAPDH	50
4.1.3. Structure et activité glycolytique de l'enzyme	52
4.1.4. Modifications post-traductionnelles de la GAPDH.....	54
4.2. Localisation et fonctions extracellulaires.....	56
4.3. Localisation et fonctions cytoplasmiques.....	57
4.3.1. Interaction avec la membrane plasmique, échanges d'informations avec le milieu extracellulaire	57
4.3.2. Interaction avec les tubulines, interface RE-golgi	58
4.3.3. Localisation mitochondriale, rôle anti- ou pro-apoptotique.....	58

4.3.4. Activité kinasique de la GAPDH, implication dans la transmission de signaux et dans l'infection des cellules.....	59
4.4. Interface Cytoplasme/Noyau	60
4.4.1. Régulation de l'expression de certains ARN, implication dans l'inflammation, l'infection et l'export d'ARNt	60
4.4.2. Translocation nucléaire de la GAPDH	60
4.5. Fonctions nucléaires	64
4.5.1. Maintien structural de la chromatine.....	64
4.5.2. Réplication.....	65
4.5.3. Régulation de la transcription	65
4.5.4. Réparation des lésions de l'ADN	66
4.5.5. Interaction Acides Nucléiques et reconnaissance d'adduits.....	68
4.6. Bilan des fonctions de la GAPDH	69
4.6.1. Diabète, inflammation, infection	69
4.6.2. Survie, prolifération cellulaire et maintenance	69
4.6.3. Activité antiproliférative et maladies neurodégénératives	70
CHAPITRE II : Objectifs des travaux de thèse.....	72
CHAPITRE III : Résultats et discussions	75
Partie I : Projet S23906-1	76
1. Interaction à l'ADN et déstabilisation	76
1.1. Validation de l'interaction du S23906-1 aux guanines	76
1.2. Déstabilisation de l'ADN	78
2. Recherche des partenaires protéiques des adduits.....	83
2.1. Identification d'un site de fixation de facteurs de transcription ciblé par le S23906-1	84
2.1.1. Utilisation de membranes TranSignal™ Protein/DNA Array	84
2.1.2. Protéines ciblant la séquence Smad-SBE.....	87
2.1.3. Vérification de l'alkylation de Smad-SBE par le S23906-1	88
2.2. Recherche du/des partenaire(s) protéique(s).....	89
2.2.1. Protéines recrutées sur l'oligonucléotide Smad-SBE.....	89
2.2.2. HMG-B1, une protéine aux multiples fonctions nucléaires	91
2.2.3. Localisation nucléaire de la GAPDH.....	91
2.3. Validation des interactions	93
2.3.1. Interaction HMG-B1/Smad-SBE alkylé ou non	93
2.3.2. Interaction GAPDH/Smad-SBE alkylé ou non	93
2.3.3. Interaction GAPDH/autres séquences alkylées ou non	99
2.3.4. Interaction GAPDH/Smad-SBE alkylé par d'autres composés	102
3. Spécificité de fixation de la GAPDH à l'ADN	107
3.1. Identification de séquences consensus par CAST-ing.....	107
3.2. Validation du consensus par retard en gel, ADN non alkylé	109
3.3. Validation du consensus par retard en gel, ADN alkylé par le S23906-1	114
3.4. Stoechiométrie et domaine d'interaction de la GAPDH à l'ADN.....	116
4. Translocation nucléaire de la GAPDH après traitement au S23906-1 ...	118

4.1. Etude de la localisation cellulaire de la GAPDH exogène après traitement au S23906-1	118
4.1.1. Mise au point de la transfection dans les cellules A549	118
4.1.2. Localisation cellulaire de la GAPDH-GFP : Time Lapse	119
4.1.3. Etude de l'interaction entre la GAPDH chimérique et Smad-SBE	120
4.1.4. Conséquences de la surexpression globale de la GAPDH	121
4.2. Etude de la localisation cellulaire de la GAPDH endogène après traitement au S23906-1	122
4.2.1. Cellules A549	122
4.2.2. Cellules HT-29	124
4.2.3. Validation par western-blot	126
5. Conséquences cellulaires de l'interaction GAPDH/adduits	127
5.1. Cellules HT-29	127
5.1.1. Invalidation transitoire de la GAPDH	127
5.1.2. Survie des cellules transfectées avec le siRNA puis traitées au S23906-1	128
5.2. Cellules A549	129
Partie II : Projet JLK1486	131
1. Introduction	131
2. Recherche d'une cible nucléotidique et peptidique	132
3. Recherche d'une cible protéique	133
Partie III : Etude de composés dérivés de la nitidine	136
Partie IV : Etude de dérivés pyrido- et thienocarbazoles de l'ellipticine	137
CHAPITRE IV : Conclusion et Perspectives	139
CHAPITRE V : Matériel et méthodes	148
1. Molécules, oligonucléotides et protéines utilisés	149
1.1. Composés	149
1.2. Oligonucléotides	149
1.3. Protéines	151
1.3.1. Protéines commerciales.....	151
1.3.2. Préparation des protéines.....	151
2. Approches moléculaires	154
2.1. Clonage	154
2.1.1. Construction plasmidique	154
2.1.2. Souche bactérienne	155
2.1.3. Transformation bactérienne.....	155
2.1.4. Amplification des plasmides	155
2.2. Méthodes d'étude des interactions ADN/ligand	156
2.2.1. Etudes biophysiques.....	156
2.2.2. Spectrométrie de masse, MALDI-TOF	157
2.2.3. Méthodes radioactives.....	157
2.3. Méthodes d'étude des interactions protéine/ADN	159
2.3.1. Modulation de fixation de facteurs de transcription à l'ADN	159

Table des matières

2.3.2. Chromatographie d'affinité.....	160
2.3.3. Retard en gel	161
2.3.4. CASTing.....	162
2.4. Analyses protéomiques	163
2.4.1. Electrophorèse monodimensionnelle (1D)	163
2.4.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2D)	164
2.4.3. Electrophorèse 2D-DIGE, marquage à saturation	165
2.4.4. Western-blotting.....	166
3. Approches cellulaires.....	167
3.1. Culture cellulaire.....	167
3.2. Microscopie de fluorescence	168
3.2.1. Localisation de la GAPDH exogène en temps réel	168
3.2.2. Localisation de la GAPDH endogène (Confocal)	169
3.3. Transfection transitoire d'un siRNA	169
3.3.1. Mise au point du protocole.....	169
3.3.2. Préparation des cellules pour l'étude du cycle cellulaire et contrôle du taux d'expression de la GAPDH	170
3.3.3. Préparation des cellules pour le test de survie	170
3.4. Cytométrie en flux	171
3.5. Evaluation de la survie cellulaire (MTS)	171
BIBLIOGRAPHIE	173

CHAPITRE I : Introduction

1. Cancer et cibles moléculaires

1.1. Terminologie et épidémiologie

Il y a plusieurs siècles, le cancer n'était pas aussi fréquent car l'espérance de vie était moins élevée. La peste, la tuberculose ou encore la diphtérie représentaient les premières causes de mortalité. Depuis le 20^{ème} siècle, avec l'accroissement de l'espérance de vie et l'augmentation de l'exposition à des éléments cancérigènes (tabac, aliments riches, polluants chimiques...), le cancer est devenu l'une des premières causes de mortalité. Ainsi, dans le **monde**, plus de 11 millions de personnes sont diagnostiquées avec un cancer chaque année, et il tue environ 7 millions de personnes tous les ans. Selon l'OMS (l'Organisation Mondiale de la Santé), le nombre de cancers pourrait atteindre **15 millions de nouveaux cas par an dès 2020**. Selon les dernières statistiques publiées pour l'Europe par l'OEC (Observatoire Européen du Cancer) en 2006, le nombre de cas incidents (nouveaux cas diagnostiqués) de cancer est d'environ 2,4 millions (en dehors des cancers de la peau non mélanomes) et le nombre de décès d'environ 1,2 millions. Le cancer est moins fréquent chez la femme (45% des cas diagnostiqués) que chez l'homme (55% des cas diagnostiqués) (*figure 1*).

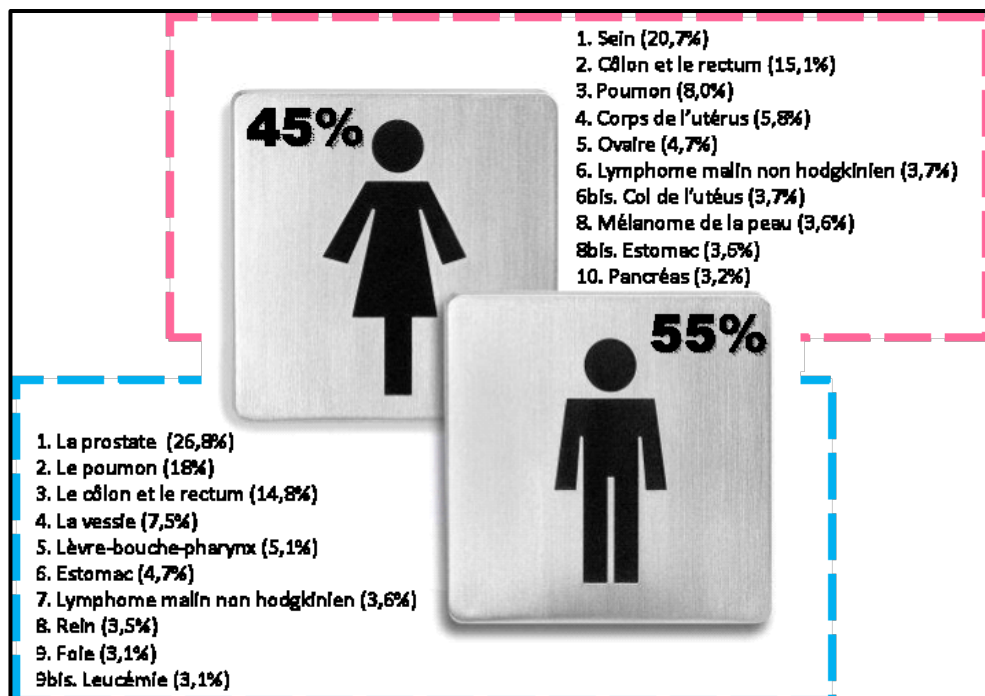


Figure 1 : Estimation de l'incidence des cancers les plus fréquents en 2006 en Europe par l'OEC.

Une « tumeur » (ou néoplasme) est une masse anormale de tissu qui peut être bénigne ou maligne (cancéreuse). Notre corps étant composé de centaines de catégories différentes de cellules, il existe alors des centaines de cancers qui peuvent être classés en fonction du type cellulaire affecté : le carcinome (tissus glandulaires et épithéliaux), le sarcome (tissu conjonctif), le lymphome (ganglions lymphatiques), le myélome (moelle osseuse) et la leucémie (éléments constitutifs du sang).

L'une des caractéristiques du cancer est la prolifération anarchique de cellules anormales qui peuvent se propager dans d'autres organes, via la circulation sanguine ou lymphatique, formant des « métastases » (*figure 2*). En effet, selon le type de cancer, les cellules vont acquérir des capacités de motilité et d'invasion différentes. Le décès par cancer est dû principalement au développement de ces métastases au niveau des organes vitaux.

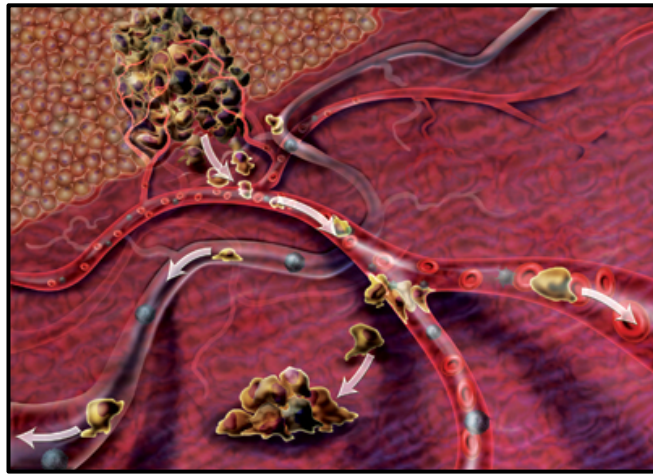


Figure 2: Propagation de cellules tumorales
(<http://anaximperator.files.wordpress.com/2009/04/metastasis.jpg>)

1.2. Tumorigenèse : Dommages à l'ADN

Les cancers sont des pathologies avec pour origine principale une altération génétique qui est somatique dans 90% des cancers humains ; les 10% restants sont associés à une altération constitutionnelle (facteur héréditaire). L'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) est le support de l'information génétique, il est empaqueté sous forme de chromosomes par association à des protéines chromatinienne au sein des noyaux des cellules eucaryotes. Selon le modèle de Watson et Crick (*figure 3A*) [18], la molécule d'ADN est formée de deux brins complémentaires enroulés en hélice de façon antiparallèle, donnant naissance à un grand et à un petit sillon.



Ces deux brins sont constitués d'un enchaînement précis (séquence) d'unités élémentaires que sont les nucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP). Un nucléotide est composé d'un phosphate relié à un sucre, le 2'-désoxyribose, lui-même relié à une base azotée. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des bases puriques, la cytosine (C) et la thymine (T) des bases pyrimidiques. Les liaisons hydrogènes qui lient les bases des deux brins complémentaires vont stabiliser la double hélice (figure 3B).

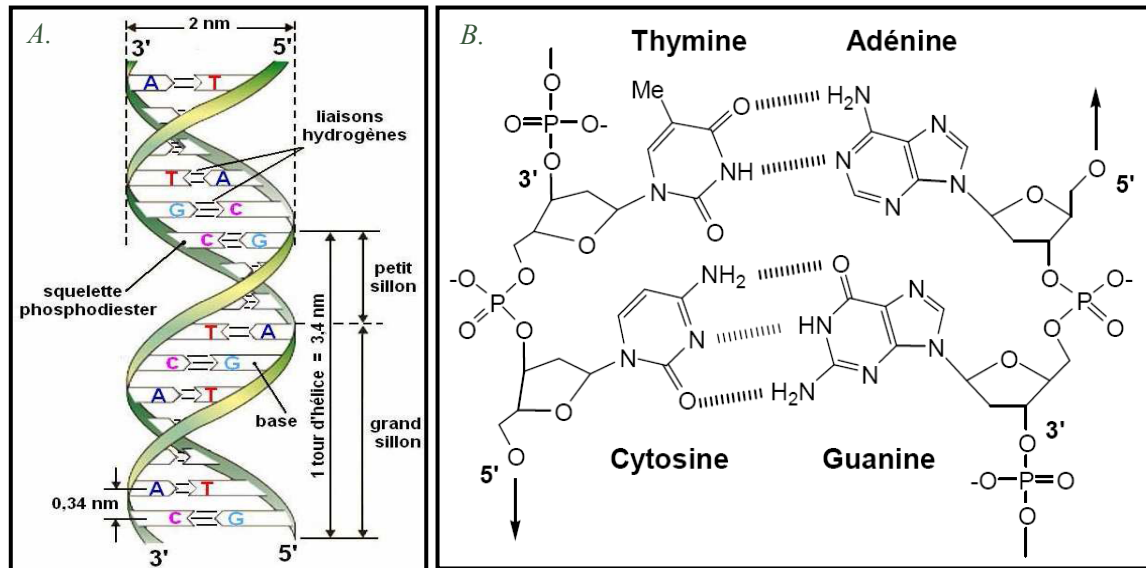


Figure 3: (A) Structure de l'ADN. (B) Appariement des bases nucléiques.

Cet ADN est continuellement soumis à des agressions. Ces altérations sont soit dues à des facteurs internes (mutations, additions ou délétions au niveau de la séquence d'ADN, modifications épigénétiques), soit dues à des facteurs externes (virus, bactéries, agents chimiques ou radioactifs, radiations électromagnétiques). En majeure partie, les modifications de l'ADN de nos cellules passent inaperçues car les systèmes de réparation de l'ADN corrigent ces défauts. Mais dans de rares cas, une mutation peut subsister et modifier l'expression de facteurs qui contrôlent la prolifération cellulaire, comme les oncogènes ou les suppresseurs de tumeur ; ces dérégulations conduiront à plus ou moins long terme à l'apparition d'un cancer.

Les lignes classiques de traitements antitumoraux sont représentées par la **chirurgie** et la **radiothérapie** (traitements locaux-régionaux), ainsi que la **chimiothérapie** (traitement systémique, agents chimiques) qui est la base de nombreux travaux de recherche du laboratoire. Pour augmenter l'efficacité et diminuer les phénomènes de résistance et de toxicité, ces traitements sont le plus souvent combinés dans le cadre d'une stratégie programmée. Enfin, on a plus rarement recours à l'**hormonothérapie** ou à l'**immunothérapie** (traitement systémique, agents biologiques), pour les cancers sensibles à ces traitements. Il est

important de rappeler que, selon le type de traitement employé, les cellules répondront de manière différente et y seront plus ou moins sensibles (radiosensibilité ou chimiosensibilité des cellules tumorales).

1.3. Historique de la chimiothérapie

Au 19^{ème} siècle, diverses méthodes « anticancéreuses » étaient déjà à l'étude, le Pr Flores y avait décrit les propriétés anti-tumorales d'un lézard d'Amérique Centrale. W. Harvey proposa également de couper l'apport vasculaire de la tumeur puisqu'il était connu que la ligature du cordon testiculaire induisait la nécrose du testicule ; ce concept fut d'ailleurs repris un siècle et demi plus tard par J. Folkman sous le nom de thérapie antiangiogénique [19].

Au début du 20^{ème} siècle, P. Ehrlich montra l'affinité de certaines matières colorantes pour les cellules vivantes (tel que le bleu de méthylène pour le tissu nerveux). Par ailleurs, sachant que certains colorants tuent les micro-organismes, il poursuivit ses recherches afin d'utiliser ces colorants à des fins thérapeutiques. En 1909, il mit au point un dérivé de l'arsenic efficace contre la syphilis, le Salvarsan, premier médicament de synthèse qu'il perfectionne par la suite sous le nom de Néosalvarsan, utilisé jusqu'en 1945 et remplacé alors par la pénicilline. Sa contribution à la mise au point de nouvelles techniques expérimentales, comme l'utilisation des cultures cellulaires pour sélectionner des substances disposant d'un effet thérapeutique potentiel (anti-bactérien, anti-tumoral...), lui vaut d'être considéré comme le père de la chimiothérapie [20].

La méchlorétamine (ou Caryolisine®), appelée plus communément gaz moutarde, est la première molécule à avoir fait la preuve d'une efficacité significative pour le traitement du cancer. C'est en 1946 que sont publiés plusieurs cas de régressions tumorales chez des patients atteints de lymphome et traités par la moutarde azotée [21]. Dès 1945, plusieurs dérivés de la moutarde azotée furent développés, dont certains sont encore utilisés aujourd'hui tels que le chlorambucile et le melphalan. D'autre part, une des premières applications du principe de sélectivité (déterminant l'index thérapeutique) sera la découverte des inhibiteurs de l'acide folique comme le méthotrexate ou encore des antimétabolites comme le 5-Fluorouracile (5-FU). Cependant, jusque dans les années 80, la plupart des médicaments anticancéreux ont été sélectionnés et développés tout en ignorant bien souvent leur mécanisme d'action au niveau cellulaire. A présent, une phase d'étude pré-clinique permet d'identifier le mécanisme d'action moléculaire, d'étudier l'effet de la nouvelle molécule sur les cellules et sur l'animal afin de déterminer les organes cibles potentiels.

Enfin, l'histoire retiendra probablement l'Imatinib (Glivec®) comme le premier agent de chimiothérapie ciblée, sélectionné selon un processus radicalement différent. Ce composé a été synthétisé spécifiquement pour inhiber l'activité enzymatique de la protéine de fusion bcr-abl suite à la découverte de la translocation t(9;22) dans la leucémie myéloïde chronique. Cependant, en l'état actuel des connaissances, tous les types de cancers n'ont pas de cibles clairement identifiées ou utilisables. Il est donc important de continuer à développer de nouvelles molécules à large spectre d'action présentant une plus grande tolérance et une moins forte toxicité. Cette recherche passe en grande partie par l'exploration de la nature comme source d'agents actifs, leur structure pouvant servir de base à l'élaboration de nouveaux médicaments pour lutter contre les cancers qui ne disposent pas ou peu de traitements à ce jour. Les plantes, les microorganismes et, plus récemment, les organismes marins représentent les principales sources d'agents anticancéreux. Depuis le début de la chimiothérapie, il a été estimé que plus de 60% des nouvelles entités chimiques introduites entre 1981 et 2006 étaient des produits naturels ou des dérivés de ces produits naturels [22].

1.4. Phénomènes de résistance

La recherche de nouvelles molécules est d'autant plus importante étant donné que 50% des tumeurs présenteraient d'emblée des phénomènes de résistance aux traitements antitumoraux. De plus certaines tumeurs peuvent développer une résistance au cours du traitement, la population cancéreuse est en effet souvent hétérogène et une sélection de clones résistants peut se produire [23]. La résistance au traitement serait due à :

- Une faible concentration intracellulaire de drogue (augmentation de l'efflux ou diminution de l'entrée) (ex : anthracyclines)
- L'inactivation de la drogue par des mécanismes de détoxification, comme l'interaction au glutathion (GSH) (ex : alkylants) ou à des métallothionéines qui sont des détoxifiants des métaux lourds (ex : cisplatine)
- La diminution de l'activité de la drogue, métabolisme de l'agent au sein de la cellule (conversion des antimétabolites en nucléotides, métabolisme hépatique ou élimination rénale)
- L'augmentation de la production d'un récepteur ou d'une enzyme impliquée dans la tumorigenèse par amplification de gène (ex : methotrexate en quantité insuffisante si amplification de la dihydrofolate réductase)

- La diminution de l'affinité à un récepteur ou à une enzyme impliquée dans la tumorigenèse (ex : les inhibiteurs de kinase ne pourront plus interagir avec les kinases mutées comme le Glivec®)
- L'augmentation de la réparation de l'ADN (ex : alkylants)
- La diminution de l'activité d'une enzyme cible (ex : inhibiteurs de Topoisomérase II telle que la doxorubicine)
- L'augmentation de l'expression du gène de résistance multidrogue *mdr1* qui code pour la glycoprotéine P, une pompe d'efflux transmembranaire dépendante de l'ATP. Dans certains cas cette résistance peut être inversé par l'utilisation de cyclosporine, de tamoxifen ou de bloqueurs de canaux calciques comme le verapamil.

Afin de remédier à ces phénomènes de résistance, des combinaisons thérapeutiques sont possibles.

1.5. Efficacité du traitement chimiothérapeutique

Sachant que la majorité des cellules tumorales se multiplient plus rapidement que les cellules saines, les molécules impliquées directement ou indirectement dans les mécanismes de prolifération cellulaire, et plus particulièrement l'ADN nucléaire et les protéines nucléaires associées, représentent de multiples cibles privilégiées des traitements antitumoraux classiques.

Afin d'augmenter l'efficacité du traitement, les agents cytotoxiques peuvent être associés dans le cadre d'un protocole de polychimiothérapie. L'utilisation simultanée de plusieurs médicaments repose sur la recherche d'un meilleur indice thérapeutique basé sur l'utilisation de molécules ayant des mécanismes d'actions différents. Par exemple, le 5-FU combiné à la leucovorin est le seul protocole depuis plus de 40 ans à montrer la plus forte activité contre les cancers colorectaux. Depuis peu, le protocole XELOX (combinaison de l'oxaliplatine par voie intraveineuse et de la capecitabine par voie orale) a montré son efficacité chez des patients présentant un cancer colorectal métastatique [24].

2. Traitement systémique, agents chimiques

Les agents chimiques sont de petites molécules synthétiques ou semi-synthétiques qui vont cibler les voies de signalisation conduisant à la prolifération ou à la mort de la cellule, le fuseau mitotique, la réplication, la transcription ou aussi la réparation de l'ADN.

2.1. Agents ciblant les voies signalétiques

➤ Depuis quelques années, les points de contrôle du cycle cellulaire sont devenus les cibles de molécules anti-tumorales. En effet, le cycle cellulaire est sous le contrôle de nombreuses protéines, dont les cyclines, les activateurs de ces cyclines, les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et leurs inhibiteurs. Une attention particulière a été portée aux inhibiteurs de CDK qui agissent majoritairement en bloquant le site ATP par compétition, tel que le **Flavopiridol** et la **Roscovitine** [25, 26].

➤ L'apoptose est un mécanisme de mort programmée qui met en jeu la perméabilisation des membranes de la mitochondrie. Le développement d'oligonucléotides antisens de *bcl-2* (**Genasens** ou **Oblimersen**) et de peptides-bloquant qui miment le domaine BH3 (**ABT263** ou **ABT737**) tend à sensibiliser les cellules à l'apoptose.

➤ Certains agents bloquent la transduction des signaux des récepteurs membranaires à leurs cibles nucléaires. Ainsi, l'un des premiers oncogènes identifiés (HER2/Neu) est ciblé par l'anticorps **Herceptin®**. Parallèlement aux approches immunologiques par anticorps, s'est développé le ciblage des activités tyrosine kinase de différents récepteurs membranaires comme l'**Iressa® (Gefitinib)** pour l'EGFR (epidermal growth factor). De nombreuses molécules sont également développées pour bloquer directement les activités transcriptionnelles de c-jun, NFκB ou STAT.

➤ Enfin de nombreuses molécules anti-angiogéniques sont en cours de développement ; les phénomènes de néo-angiogenèse passant par la transcription et la sécrétion de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales sous l'effet de l'hypoxie.

2.2. Anti-métabolites

Ces composés vont bloquer la synthèse des acides nucléiques en phase S du cycle cellulaire, soit en inhibant les protéines nécessaires au métabolisme des bases puriques et pyrimidiques, comme par exemple le **méthotrexate (MTX ou Ledertrexate®)** et le **pemetrexed (Alimta®)** qui sont des antifolates, ou alors l'**hydroxyurée (hydroxycarbamide ou Hydrea®)** qui inhibe la ribonucléotide-diphosphate réductase ; soit en se substituant aux bases azotées, comme le **5-FU** ou la **cytarabine (cytosine arabinoside, Ara-C, Aracytine®, Cytarbel®, ou Cytosar®)** qui sont des antipyrimidiques, ou la **6-mercaptopurine (6-MP, Purinéthol®)** et la **6-thioguanine (Lanvis®)** qui sont des antipuriques ; soit encore en hydrolysant la L-asparagine, qui est un précurseur de la synthèse protéique, comme par exemple la **L-asparaginase (Kidrolase®)**.

2.3. Antitubulines

Au cours de la prophase, chaque centrosome se place à un pôle de la cellule pour initier la polymérisation des tubulines alpha et beta en microtubules pour former le fuseau mitotique. C'est ce fuseau qui capture les chromosomes et les positionne sur la plaque équatoriale métaphasique pour les séparer ensuite en deux jeux égaux. Les antitubulines interagissent avec les tubulines et bloquent ainsi la dynamique de *polymérisation* (Vincalcoïdes : **vinblastine (Velbe®)** et **vinorelbine (Navelbin®)**) / *dépolymérisation* (Taxanes : **paclitaxel (Taxol®)** et **docetaxel (Taxotère®)**) des microtubules.

2.4. Inhibiteurs de Topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes assurant la condensation / décondensation de l'ADN après avoir créé des coupures transitoires de l'un (topoisomérase I) ou des deux (topoisomérase II) brins, puis leur ligation, permettant une relaxation des forces de torsion générées au moment de la réplication.

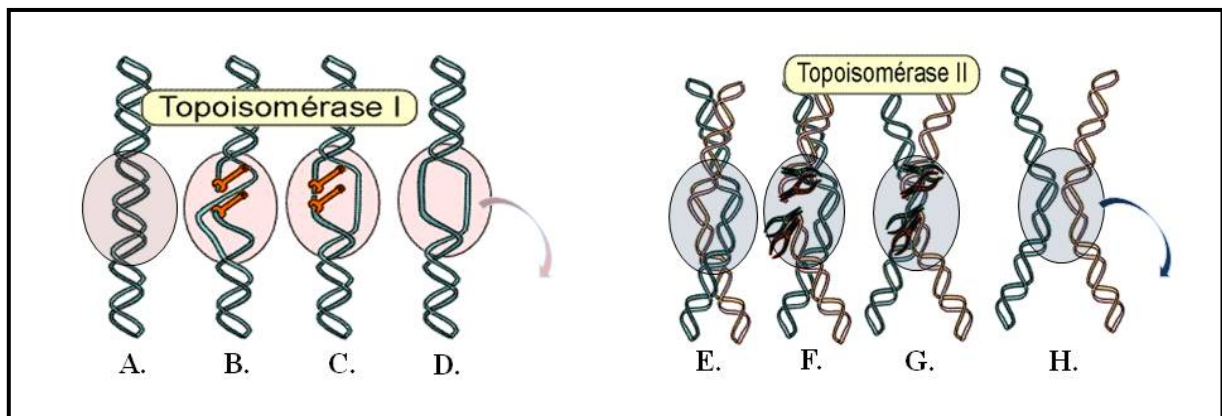


Figure 4: Activité de la topoisomérase I et de la topoisomérase II, d'après <http://acces.inrp.fr/>. (A) Liaison non covalente de la topoisomérase I à l'ADNdb. (B) Clivage d'un brin et liaison covalente de l'enzyme à l'extrémité 3' de ce brin. (C) Relaxation de l'ADN et religation. (D) Libération de la topoisomérase I. (E) Fixation du dimère topoisomérase II. (F) Hydrolyse d'ATP et coupure des brins. (G) Hydrolyse d'ATP et séparation des brins du premier ADN par rapport aux brins non coupés du deuxième ADN. (H) Religation et hydrolyse d'ATP suivie d'une libération de la topoisomérase II.

Les inhibiteurs des ADN topoisomérases I (**irinotecan** (ou **Campto®**) et le **topotecan** (**Hycamtin®**)) ou de topoisomérase II (telle que l'**aclarubicine** qui inhibe la fixation à l'ADN et la **novobiocine** qui inhibe la fixation de l'ATP) ne s'intercalent pas dans l'ADN mais bloquent le site catalytique. L'**etoposide** (**Celltop®**, **Etopophos®** ou **Vépéside®**) agit comme un poison en stabilisant le complexe de clivage [ADN/topoisomérase II] et en empêchant l'étape de religation, ce qui provoque une coupure définitive des brins d'ADN. Certains

intercalants peuvent aussi empêcher le recrutement de la topoisomérase II, mais aussi de la topoisomérase I comme par exemple le composé **Hoechst 33342**.

2.5. Agents intercalants de l'ADN

Ce sont des molécules caractérisées par plusieurs noyaux aromatiques condensés, de dimension et structure telles qu'elles provoquent une détorsion de la molécule d'ADN et donc un empêchement de la progression des ARN et ADN polymérase ainsi qu'une inhibition de la réplication et de la transcription. La présence de substance intercalée entre les deux brins de l'ADN peut perturber aussi l'action de l'ADN topoisomérases I et II (cf paragraphe précédent) et provoquer des cassures mono- et bicaténares. Il existe différents groupes utilisés en clinique : comme les Anthracyclines (**doxorubicine (Adriblastine®)**, **Myocet®** ou **Caelyx®**) et la **daunorubicine (Cérubine®** ou **Daunoxome®**), les Anthracènes (**mitoxantrone (ou Novantrone®)**) ou les Phenoxazines (**dactinomycine** et **actinomycine-D (ou Cosmegen®)**).

Ces molécules génèrent pour certains des radicaux libres (quinones, diols, époxydes, superoxydes, peroxyde d'hydrogène) pouvant altérer les membranes plasmiques et s'associer à l'ADN en tant qu'alkylant. Certains inhibiteurs de topoisomérase II, comme la doxorubicine (aTAa), présentent une sélectivité de séquence [27].

2.6. Agents clivant l'ADN

La substance qui est actuellement la plus connue pour ses propriétés de clivage de la double hélice d'ADN est la **bléomycine (Blenoxane®)** [28]. Son mode d'action met en jeu des coupures des brins d'ADN résultant d'une réaction radicalaire au niveau du désoxyribose des nucléotides GT ou GC. Les antibiotiques naturels de type Enediynes (**dynemicin A** et **neocarzinostatin**) ont également un fort potentiel de clivage de l'ADN.

2.7. Agents alkylant l'ADN

2.7.1. Définition

Les agents alkylants sont des composés fortement électrophiles qui vont réagir avec des molécules possédant des radicaux nucléophiles tels que les groupements -SH, -OH, -COOH ou -NH₂ que l'on retrouve dans les acides nucléiques et les protéines (*figure 5*).



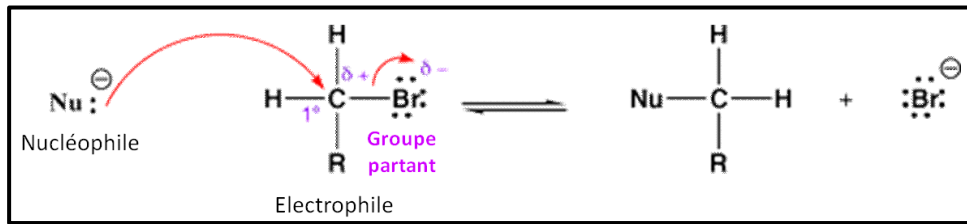


Figure 5: Réaction chimique entre un nucléophile et un électrophile, formation d'une liaison covalente.

L'interaction par liaison covalente entre l'agent alkylant et l'ADN produit différents types d'adduits:

- en fonction de l'isomérisie et du métabolisme de l'alkylant, la fixation se fait de manière partielle ou quasi-complète ;
- monovalents (sur un nucléotide) ou bivalents (l'alkylant relie deux nucléotides adjacents pour former des ponts inter- ou intra-brins) (*figure 6*);
- au niveau de sites plus ou moins préférentiels au sein de l'ADN ;
- qui modifieront la structure de la double hélice (stabilisation/déstabilisation).

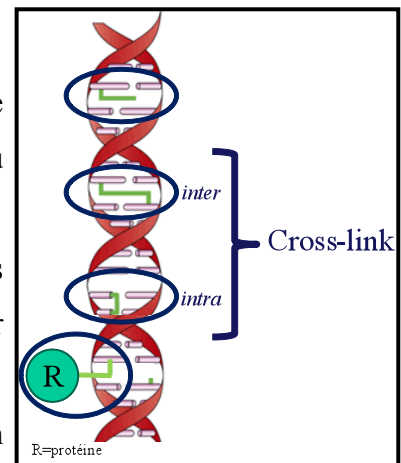
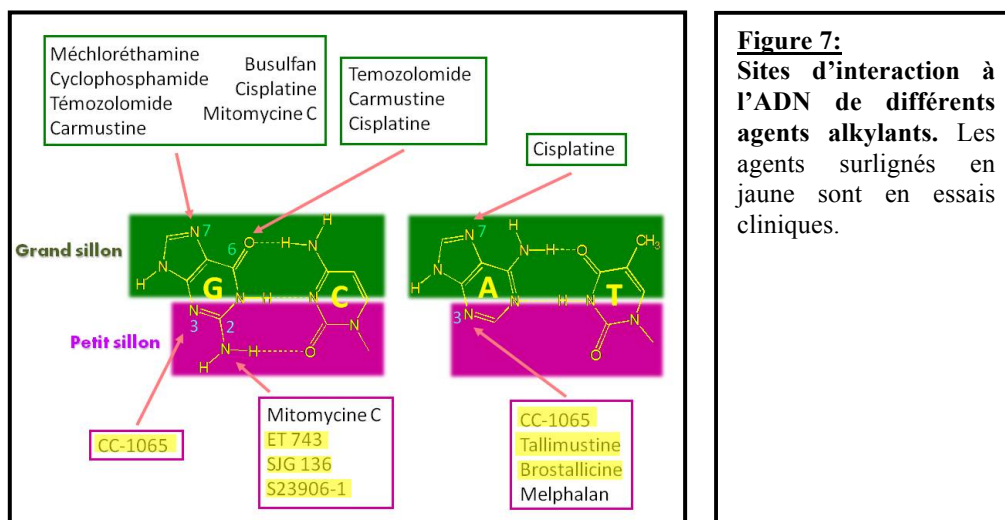


Figure 6: Interactions mono- ou bivalentes produites par les agents alkylants.

La fixation de ces molécules à l'ADN et notamment la formation de crosslinks interbrins empêche la réplication et la transcription [13]. De plus, ces lésions induisent souvent des cassures simple- ou double-brins de l'ADN ce qui conduit à l'apoptose de la cellule ou à la mise en exécution des systèmes de réparation pour le maintien de la prolifération des cellules tumorales (phénomène de résistance).

Les agents alkylants se fixent principalement au niveau des bases puriques, plus particulièrement au niveau des guanines qui présentent quatre sites potentiels de fixation (N2, N3, N7 et O6), alors que les adénines n'en présentent que deux (N7 et N3) (*figure 7*). L'azote N7 de la guanine est la cible principale de l'alkylation puisqu'il a le plus haut potentiel électrophile de l'ADN, puis les suivants ont des potentiels de moins en moins élevé : O6-guanine et N3-adénine > N2-guanine, N3 guanine et N7-adénine [29].

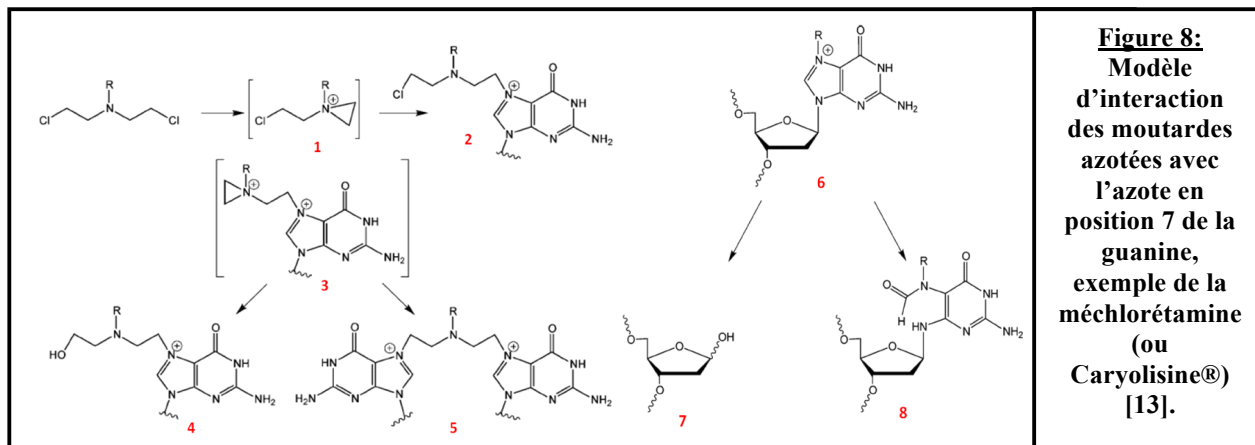


Par rapport aux caractéristiques énumérées plus haut, les agents alkylants présenteront une efficacité cytotoxique et une activité anti-tumorale propre. La compréhension du mécanisme d'action de chacun d'entre eux permettra le développement de nouvelles molécules qui contourneront les éventuels phénomènes de résistance rencontrés. Dans un premier temps, il est donc important de présenter les avantages et les inconvénients de certains agents alkylant le grand sillon, connus pour la plupart depuis les années 40. Dans un second temps, nous verrons que les agents alkylant le petit sillon, découverts plus récemment, sont faiblement représentés et la majorité d'entre eux sont encore en essai clinique (figure 7). Ces agents sont très prometteurs car ils pourraient contourner les phénomènes de résistance rencontrés avec certains agents alkylant du grand sillon.

2.7.2. Agents alkylant le grand sillon

2.7.2.1. Les moutardes azotées

Les propriétés cytotoxiques des moutardes azotées sont dues principalement à la formation de ponts interbrins (figure 6). Cependant, seulement 10% de ces composés forment *in vivo* des interactions bivalentes avec l'ADN [30]. Les composés vont réagir principalement avec la position N7 des résidus guanines [31, 32] via un intermédiaire aziridinium (figure 8.1) pour former une guanine N7-alkylée (figure 8.2). Ce mono-adduit va ensuite former un second intermédiaire aziridinium (figure 8.3), qui pourra soit réagir avec l'eau (figure 8.4) ou avec un second résidu guanine pour former le cross-link entre deux brins de séquence 5'-GNC (figure 8.5) [31-33]. Cependant, les guanines N7-alkylées (figure 8.6) sont peu stables, une rupture du pont N-glycosyl peut avoir lieu, ce qui crée un site abasique (figure 8.7) ou un dérivé formamido-pyrimidine (FAPY), plus stable (figure 8.8)[13].



En général, la contrainte provoquée par ce type de crosslink, entre deux G d'une séquence 5'GNC, ne permet pas de produire une distorsion de l'hélice. Cependant, des études structurales ont déjà montré une courbure de 14° de l'ADN suite à la formation d'un crosslink avec la **méchlorétamine** (ou **Caryolisine®**) [34]. Celle-ci est utilisée pour le traitement de la maladie de Hodgkin. Cette molécule interagit directement avec l'azote en position 7 des guanines [34]. Le **cyclophosphamide** (ou **Endoxan®**) est quant à lui utilisé pour le traitement adjuvant des cancers du sein et des ovaires, pour le traitement des sarcomes, des neuroblastomes, des lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, des myélomes et dans certaines leucémies aiguës lymphoïdes. Celui-ci doit être activé par des enzymes hépatiques (telle que CYP2B6) pour ensuite pouvoir interagir avec l'azote en position 7 des guanines.

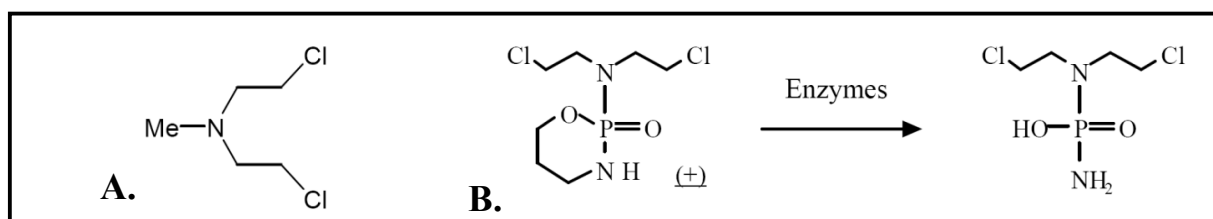
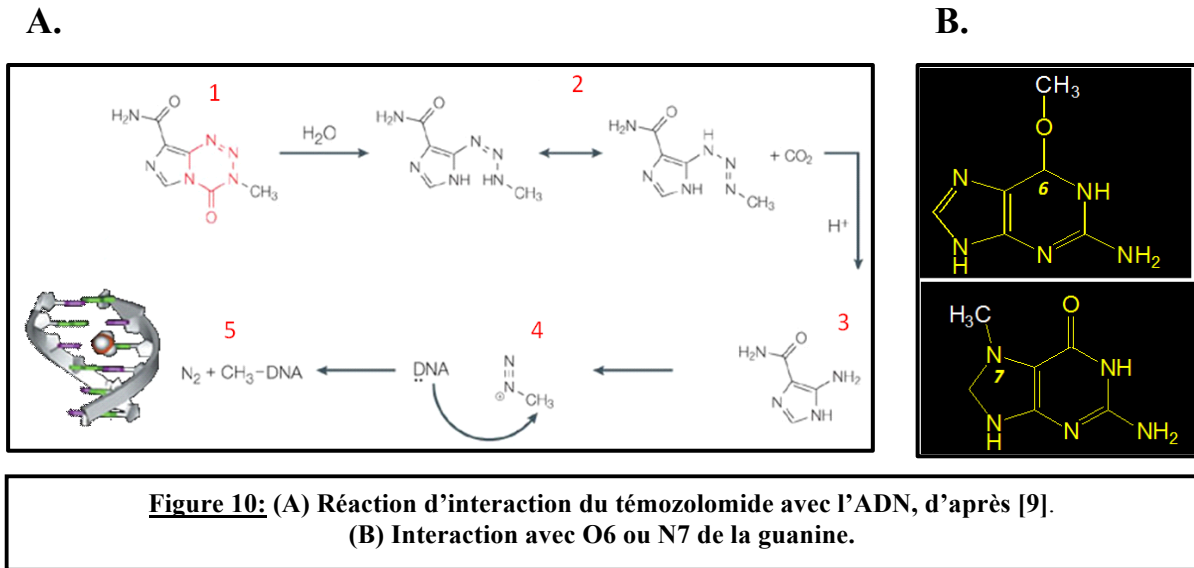


Figure 9: (A) Structure de la méchlorétamine. (B) Structure du cyclophosphamide avant et après action des enzymes hépatiques.

Le **témozolomide** (ou **Tomodal®**) (figure 10.1) est un composé monovalent, activé via une hydrolyse enzyme-indépendante suivie d'une décarboxylation pour former le 5-méthyltriazenoimidazole-4-carboxamide (MTIC) (figure 10.2) puis le 5-aminoimidazole-4-carboxamide (figure 10.3) et enfin les ions methyl diazonium (figure 10.4), l'espèce réactive qui méthyle un des deux brins d'ADN en position N7 ou O6 des guanines (figure 10.5).



Le témozolomide est administré pour traiter les mélanomes et les gliomes malins. Cependant pour ce dernier type de cancer, plusieurs cas de chimiorésistance ont été rencontrés. En effet, les lésions induites par le témozolomide en position O6 et N7 de la guanine sont reconnues par une O6-méthyl-guanine DNA méthyl transférase (MGMT) et par une méthylpurine glycosylase (MPG) suggérant une réparation plus importante de la lésion [35] (figure 11).

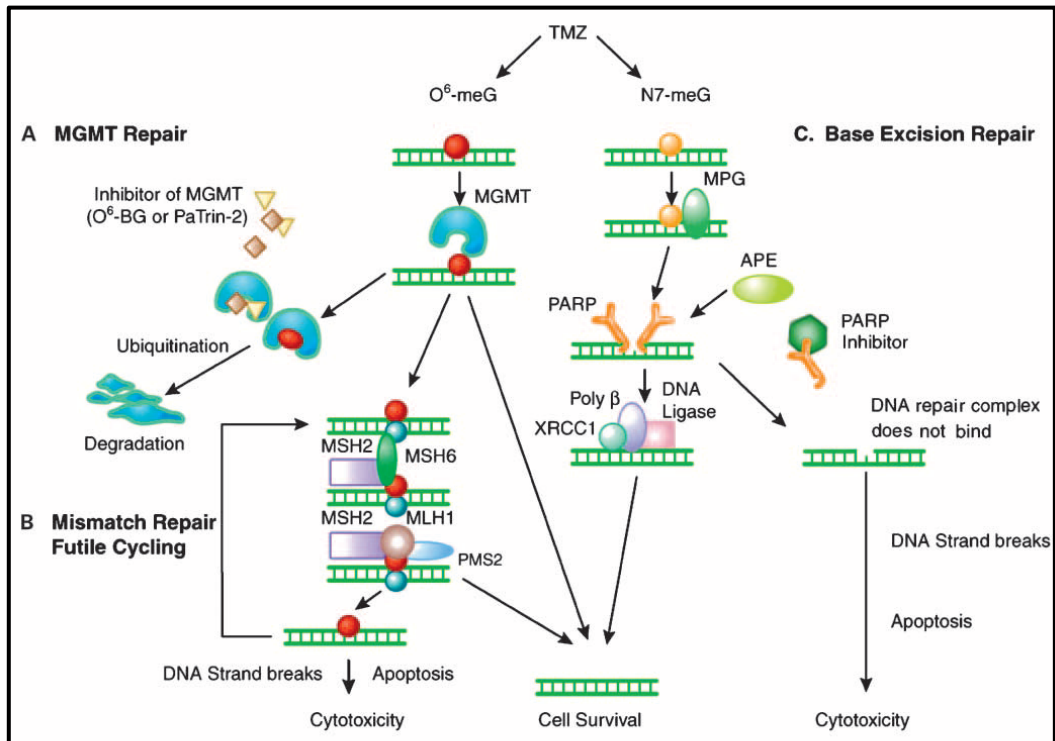


Figure 11: Voies de réparation des lésions induites par le témozolomide, d'après [11]. Ces lésions sont reconnues par la MGMT ou la MPG, qui activeront à leur tour les voies de réparation MMR (Mismatch Repair) ou BER (Base Exision Repair). Les lésions seront toxiques pour la cellule.

2.7.2.2. Les moutardes souffrées ou alkyl-sulfonates

Le **busulfan** (ou **Misulban®**) est un agent alkylant bifonctionnel qui interagit avec l'azote en position 7 des guanines. Il n'est indiqué que dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC).

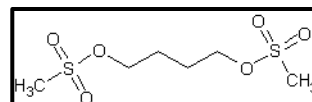


Figure 12: Structure du busulfan.

2.7.2.3. Les nitrosourées

Les nitrosourées sont des molécules liposolubles, ce qui favorise leur passage à travers la barrière-hémato-encéphalique. La **carmustine** (ou **BCNU** ou **Bicnu®**) est utilisée dans le traitement des tumeurs cérébrales malignes. Elle interagit principalement en N7 ou O6 des guanines [36] et peut former ou non des crosslinks interbrins [37, 38].

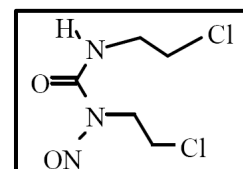


Figure 13: Structure de la carmustine.

Même si les crosslinks ne représentent que 8% des adduits totaux, la cytotoxicité serait liée majoritairement à leur formation [39]. De plus, les lésions induites en O6 par les nitrosourées sont réparées par une MGMT comme pour le témozolomide [40, 41]. Un traitement préalable avec un inhibiteur de MGMT sensibilise les cellules à la carmustine et au témozolomide [42]. Enfin, la carmustine stabilise la double hélice et induit une distorsion minimale de l'ADN [43].

2.7.2.4. Les sels de platine

Les dérivés platinés font partis des agents anticancéreux les plus prescrits, ils sont en effet utilisés pour traiter un large spectre de tumeurs humaines. Les sels de platine se fixent principalement au niveau de l'azote en position 7 des guanines.

Le **cisplatine** (ou **cis-diamminedichloroplatinum(II)** ou **Cysplatyl®**) possède deux atomes de chlore labiles et deux groupements ammoniacaux inertes de conformation *cis* reliés à un atome de platine central. Le composé interagit avec N7-guanine mais aussi avec d'autres sites du grand sillon de l'ADN comme O6-guanine et N7-adénine. Les adduits monofonctionnels ne représentent que 1 à 2% des lésions formées par le cisplatine et peuvent donner naissance à des pontages ADN-protéine [44]. Les lésions les plus rencontrées sont les crosslinks intrabrin d(GpG) (65%) ou encore d(ApG) (25%) (figure 15).

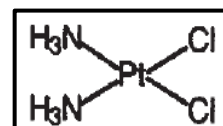


Figure 14: Structure du cisplatine.

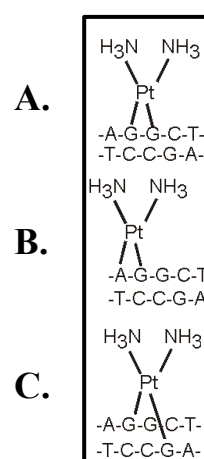


Figure 15: Nature des adduits bifonctionnels du cisplatine formés avec l'ADN. (A) Adduit d(GpG). (B) Adduit d(ApG). (C) Adduit interbrin.

On observe seulement 5 à 10% de crosslinks interbrins (ICL)s (entre deux guanines) et 5 à 10% de crosslinks intrabrin sur la séquence d(GpNpG) [45]. Même quand il est lié à des structures biologiques, le cisplatine conserve sa disposition planaire de conformation *cis*, essentielle à son activité. Les composés *trans*, ne pouvant pas produire de crosslink intrabrin, n'ont quasiment aucune activité anti-tumorale [46].

L'interaction du cisplatine va également induire des altérations structurales de la double hélice puisqu'il entraîne des courbures et des déroulements plus ou moins importants de l'ADN. Ces modifications structurales ont été étudiées par trois approches différentes: gel d'électrophorèse (a), cristallographie aux rayons X (b) et résonance magnétique nucléaire (RMN) (c) qui ont été résumés dans le tableau 1.

Adduit	Courbure de l'ADN (en°)	Déroulement de l'ADN (en °)	Références bibliographiques
-ADN/protéine	0	5 (a)	[47]
	32-34 (a)	13 (a)	[47]
-Intrabrin d(GpG)	39-55 (b)	nd	[48]
	78 (c)	25 (c)	[49]
	58 (c)	21 (c)	[50]
-Intrabrin d(ApG)	32-34 (a)	13 (a)	[47]
	55(c)		[51]
-Interbrin	45 (a)	79 (a)	[52]
	47 (b)	70 (b)	[53]
	20 (c)	87 (c)	[54]

Tableau 1: Courbures et déroulements induits par différents adduits du cisplatine, d'après [10].

Dans les cellules résistantes au cisplatine, les lésions de l'ADN vont être mieux réparées suite, principalement, à la surexpression des protéines impliquées dans la voie NER (Nucleotide Excision Repair) [55-58]. De plus, les liaisons intrabrins d(GpNpG) sont mieux réparées par la voie NER que les d(GpG) [59]. En effet, il a été montré que certaines protéines HMG (HMG-1 et HMG-2) avaient une haute affinité et spécificité de fixation pour les adduits 1,2d(GpG) [60]. Cette reconnaissance empêche la fixation des protéines de la voie de réparation NER et augmente ainsi la sensibilité des cellules au cisplatine [61]. Le complexe hMutS α et hMSH2 de la voie de réparation MMR peut également reconnaître les crosslinks d(GpG) ou d(ApG) [62]. De plus, les cellules qui ont une voie MMR active sont plus sensibles au cisplatine [63-65].

L'**oxaliplatine** (figure 16), qui forme moins d'adduit que le cisplatine, est pourtant plus efficace car les adduits sont plus difficiles à réparer, mais surtout l'oxaliplatine n'a pas besoin d'une machinerie MMR fonctionnelle, et est donc plus efficace sur les lignées tumorales déficientes en MMR [66].

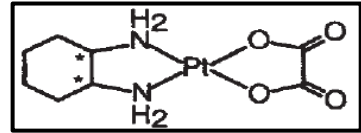


Figure 16 : Structure de l'oxaliplatine.

2.7.2.5. Aziridine (Mitomycine C)

La **mitomycine C** (ou **Ametycine®**) est utilisée dans le traitement du cancer du sein, du colon et de la vessie. Elle interagit avec l'azote en position 7 ou 2 des guanines via le groupement aziridine après activation *in vivo* par des flavoréductases. Son activité est donc sélective des régions hypoxiques des tumeurs solides. Ce composé se lie à l'ADN sous forme d'adduit mono- ou bivalent inter- ou intrabrin (figure 17) [1] et induit une distorsion mineure de la double hélice [67]. Cependant, si la mitomycine C est activée dans le cytoplasme, elle ne pourra plus interagir avec l'ADN dans le noyau.

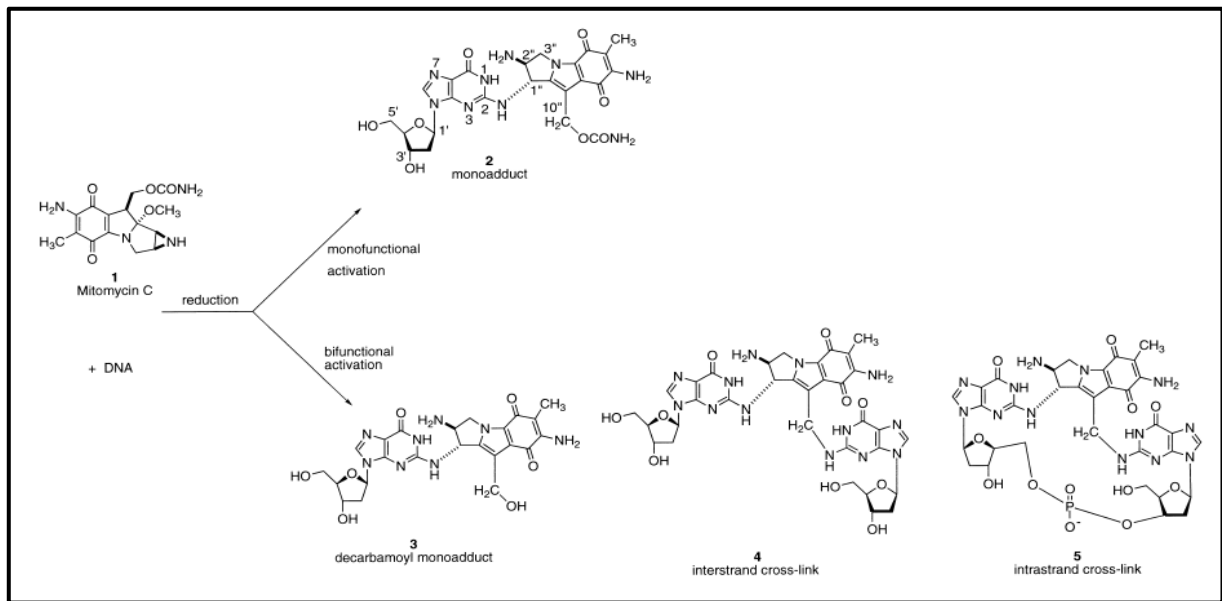


Figure 17 : Adduit mitomycine C/ désoxyguanosine [1]

2.7.3. Alkylants du petit sillon

2.7.3.1. Dérivés de la distamycine A

Les dérivés de la distamycine A (figure 18) interagissent plutôt au niveau de l'azote en position 3 des guanines. Le **tallimustine** est le dérivé de la distamycine A le plus connu. Il présente la structure de base de la distamycine A avec en plus un groupement benzoyle de

moutarde azotée (figure 19). La **brostallicine** est un autre dérivé synthétique, actuellement en essai clinique de phase I-II chez des patients présentant une résistance à différents agents de chimiothérapie, notamment associé à une surexpression de la GSH-S-transférase [68, 69]. En effet, la brostallicine doit être activée par le GSH pour pouvoir interagir avec l'ADN, alors que dans la plupart des cas, le GSH agit plutôt comme un agent détoxifiant [70].

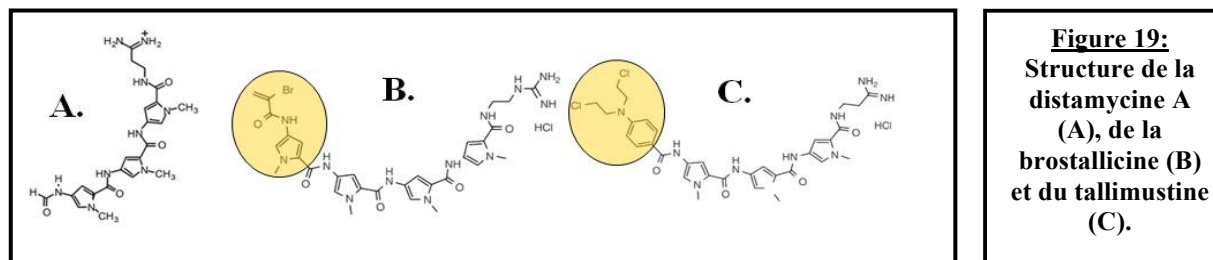


Figure 19:
Structure de la distamycine A (A), de la brostallicine (B) et du tallimustine (C).

2.7.3.2. Dérivés cyclopropylindole

Le **CC-1065** (figure 20) a une forte efficacité *in vitro* (cellules leucémiques, mélanome, cancer du sein, de l'ovaire, du pancréas, neuroblastome) mais une trop forte hépato-toxicité sur les modèles expérimentaux. Il interagit avec l'azote en position 3 des adénines ou des guanines. Ce composé stabilise localement la double hélice [71], mais induit aussi une courbure générale de l'ADN [72].

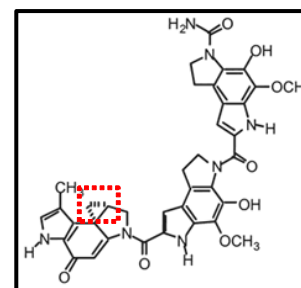


Figure 20: Structure du CC-1065.

2.7.3.3. SJG-136

Le **SJG-136** (ou **Spirogen** ou **NSC694501**) est un dimère pyrrolobenzodiazépine. Celui-ci est le composé le moins électrophile connus des agents alkylant l'ADN. Cette propriété lui permet alors de ne pas être désactivé par des éléments nucléophiles de la cellule avant son interaction avec l'ADN. Contrairement au CC-1065, le SJG-136 interagit avec deux N2-guanines séparées par 2 paires de bases au niveau d'une séquence spécifique (5'-PuGATCPy-3') (figure 21) [73, 74].

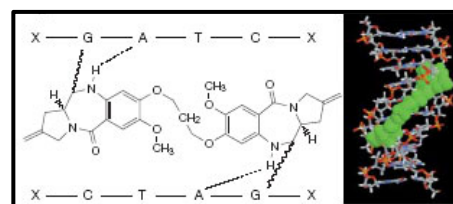


Figure 21: Structure du SJG-136 formant un crosslink interbrin entre deux guanines [9].

In vivo, il est plus efficace que le cisplatine alors les ICLs (crosslinks interbrins) produits par chacun des composés sont tous deux réparés par ERCC1-XPF (protéines de la voie NER, voir figure 31) [75]. De plus, le SJG-136 est 100 fois plus efficace que le **melphalan** (ou **Alkeran®**) sur différentes cellules CHO (Chinese hamster ovary). En effet, les ICLs produits par le SJG-136 sont plus persistants que ceux produits par le melphalan (interaction avec N3-adénine) [74, 75]. Contrairement au cisplatine et au CC-1065, le SJG-

136 n'induit pas de distorsion de l'ADN [73]. Bien que les ICLs sembleraient responsables de l'activité cytotoxique du SJG-136, une étude récente a montré que le SJG-136 pouvait induire également des mono-adduits et des crosslinks intrabrin. Cela expliquerait pourquoi ce composé est plus efficace que le CC-1065 et le cisplatine alors qu'il n'induit pas de torsion de la double hélice [76].

Le SJG-136 est actuellement en essai clinique de phase I-II chez des patients présentant des tumeurs solides avancées [77, 78].

2.7.3.4. ET-743

L'ET-743 (Ecteinascidin 743 ou Trabectedin ou Yondelis®) (figure 22) est en phase III d'essai clinique pour le cancer de l'ovaire et a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement du sarcome de tissu mou évolué en seconde ou première intention. Ce composé naturel d'origine marine interagit avec N2-guanine sous forme de mono-adduit [15]. Il présente également une certaine sélectivité de séquence puisqu'il se fixe de manière plus importante sur une séquence 5'-AGGCA-3' [79].

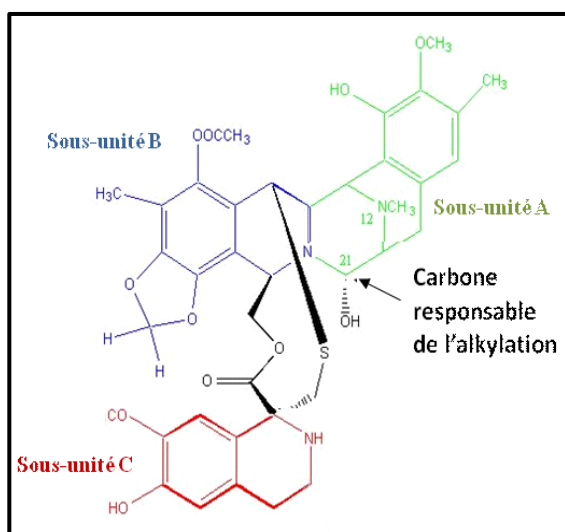


Figure 22: Structure de l'ET-743. Il est composé de 3 cycles tétrahydroisoquinoline : le A et le B interagissent avec l'ADN et le C se retrouve à l'extérieur du petit sillon, où il peut interagir avec des facteurs de transcription [15]. Le carbone C21 impliqué dans l'interaction avec l'ADN est localisé sur la sous-unité A.

Contrairement aux autres alkylants du petit sillon, l'ET-743 courbe l'ADN vers le grand sillon tout en stabilisant les deux brins de la double hélice [15, 80]. De manière tout à fait originale, l'ET-743 empêche la fixation du facteur de transcription NF-Y et inhibe ainsi l'expression d'une pompe d'efflux des drogues, la glycoprotéine P [15, 81]. L'ET-743, en concentration plus élevée, inhibe la fixation d'autres facteurs de transcription comme TBP (TATA binding protein), E2F et SRF (régulateurs du cycle cellulaire) [82]. Cette inhibition de la transcription est constitutive [80, 83]. L'ET-743 bloque notamment la progression de la phase S conduisant à une accumulation des cellules en phase G2/M, via une inhibition de la

transcription des gènes essentiels à la progression du cycle, et engendre ainsi une apoptose indépendante de p53 [84-86]. Enfin, l'activité cytotoxique d'ET-743 est liée également à une mauvaise réparation via la voie TC-NER (Transcription-coupled NER). Ainsi, contrairement aux autres agents alkylants, l'ET-743 est moins efficace sur les cellules déficientes en TC-NER de part un blocage de XPG (une protéine de la voie de réparation NER, voir figure 31) au niveau de la lésion, empêchant la réparation de l'adduit [87], et induisant des DSBs (cassures doubles brins de l'ADN) [88].

Les lésions de l'ADN les plus toxiques connues à ce jour sont les crosslinks interbrins (ICLs), qui sont produits par des agents alkylants bi-fonctionnels. En effet, elles vont bloquer les processus cellulaires qui nécessitent une séparation des deux brins de l'ADN, comme la transcription et la réplication [13]. Cependant, il existe de nombreuses voies de réparation des ICLs, notamment la voie NER avec ERCC1-XPF [89] qui va engendrer une résistance des cellules aux agents alkylants.

De manière intéressante, l'étude du mécanisme d'action des agents alkylant a mis en évidence le recrutement de protéines de la machinerie cellulaire au niveau des lésions, qui vont alors augmenter la toxicité de l'agent, comme par exemple le recrutement de XPG au niveau de l'adduit ET-743 ou de HMG-B1 au niveau de l'adduit cisplatine, et inhiber la réparation de la lésion. Notre projet repose sur l'étude du mécanisme d'action d'un autre agent alkylant le petit sillon de l'ADN entré en phase I d'essai clinique: le S23906-1. Ses caractéristiques originales seront développées dans la partie suivante.

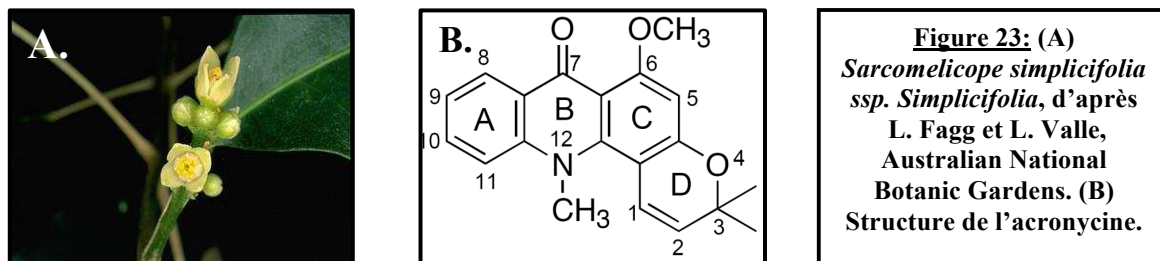
3. Le S23906-1

3.1. Découverte de l'acronycine et synthèse de dérivés pentacycliques

L'acronycine (3,12-dihydro-6-methoxy-3,3,12-trimethyl-7H-pyrano[2,3-c]acridin-7-one) a été découverte en 1948. Cet alcaloïde a été isolé pour la première fois à partir de l'écorce d'un arbuste (Rutaceae) d'origine australienne *Acronychia baueri* Schott (= *Sarcomelicope simplicifolia* (Endl.) Hartley ssp *simplicifolia*), par l'équipe de Hughes et Lahey [90]. Sa structure moléculaire a ensuite été établie par MacDonald et Robertson, ils ont



montré que le cycle pyrane était fusionné de manière angulaire au squelette de base acridone, puis c'est en 1970 que l'acronycine a été cristallographiée [91, 92].



En 1966, l'équipe de Svoboda (laboratoire Eli Lilly) a montré son intérêt en tant qu'agent antitumoral à large spectre sur les tumeurs solides *in vivo*, notamment sur des tumeurs résistantes à d'autres agents de chimiothérapie (le sarcome 180, le carcinome S-115, le mélanome S-91 et plus particulièrement le myelome X-5563) [93]. En raison de sa faible puissance et de sa quasi-insolubilité dans l'eau et les solvants biocompatibles, l'acronycine est administrée aux patients sous forme de capsule à avaler. L'activité envers la lignée X-5563 étant intéressante, les essais cliniques ont été effectués sur des patients présentant un myelome multiple réfractaire. Ces essais se sont cependant limités aux phases I-II du fait des problèmes de formulation conduisant à de trop fortes toxicités gastrointestinales et neurologiques [94].

Le mécanisme d'action de l'acronycine au niveau cellulaire et moléculaire n'est pas encore bien déterminé. Dans les années 70, certains auteurs suggèrent que l'acronycine n'interagirait pas directement avec les acides nucléiques mais générerait indirectement la synthèse d'ADN et d'ARN [95]. Des expériences montrent en effet que l'alkaloïde agit principalement en altérant les membranes des organelles ou de la surface cellulaire [96-98]. Par conséquent, il bloque la division cellulaire pour donner une binucléation et ainsi réduit l'assemblage des nucléosides [99]. Dans les années 80, Dorr et Liddil suggèrent malgré tout une possible réactivité de l'acronycine avec l'ADN, puisque l'acronycine stabiliserait la double hélice lors d'une dénaturation thermique [100]. Les effets de l'acronycine sur le cycle cellulaire ne sont pas clairement établis [101].

L'isolement de dérivés de l'acronycine à partir d'autres arbustes du genre *Sarcomelicope* (Rutaceae), notamment le dérivé 1-2 époxy-acronycine (figure 24), ont mis en évidence la possibilité d'une bio-activation *in vivo* [102]. Cependant, l'instabilité chimique de l'époxyde rendait impossible son utilisation comme agent antitumoral [103]. Par la suite, de nombreux autres dérivés d'origine naturelle ont été isolés, et de nombreux composés synthétiques plus stables et présentant une meilleure solubilité ont été produits (figure 24). Ces composés se sont avérés à la fois plus puissants et plus actifs que l'acronycine sur les lignées cellulaires et *in vivo* [103].

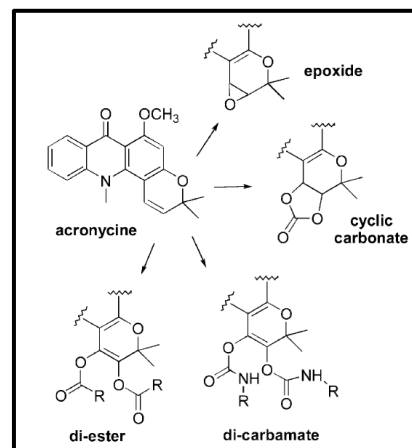


Figure 24: Structure de base des dérivés de l'acronycine [16].

Dans les années 90, il a été montré que certains dérivés semi-synthétiques de l'acronycine interagissent avec l'ADN de thymus de veau, de foie de veau, et avec une variété de (désoxy)ribonucléotides simple ou double brins. Bien qu'aucune spécificité de séquence ne soit observée, il a été proposé que cette interaction jouerait un rôle important dans l'activité cytotoxique du composé [101]. En 2000, afin de favoriser cette interaction, les chimistes du laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Paris V ont synthétisés des dérivés diesters optimisés par l'addition d'un noyau aromatique fusionné au squelette de base acronycine [104] (figure 25). La benzo[*b*]acronycine présente une meilleure activité cytotoxique *in vitro* par rapport à la benzo[*a*]; la benzo[*c*] est quant à elle 4 à 5 fois moins active que les deux précédents, et elle présente alors quasiment la même activité que l'acronycine [105].

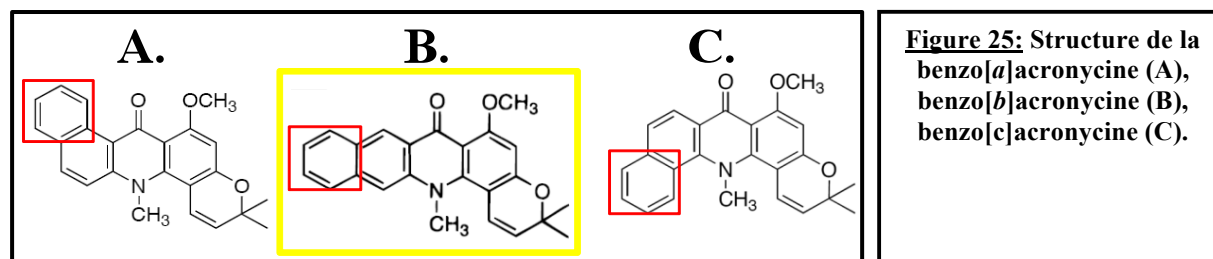


Figure 25: Structure de la benzo[*a*]acronycine (A), benzo[*b*]acronycine (B), benzo[*c*]acronycine (C).

Plusieurs dérivés ont été synthétisés et testés, notamment des dérivés de la benzo[*b*]acronycine [105-107].

3.2. Mécanisme d'action du S23906-1

Le S23906-1 (*cis*-1,2-diacétoxy-1,2-dihydrobenzo[*b*]acronycine) (figure 26), développé par l'Institut Servier, a été sélectionné parmi ces composés pour son potentiel cytotoxique *in vitro* [108] et son activité anti-tumorale *in vivo* sur de nombreux modèles anti-tumoraux [104, 109].

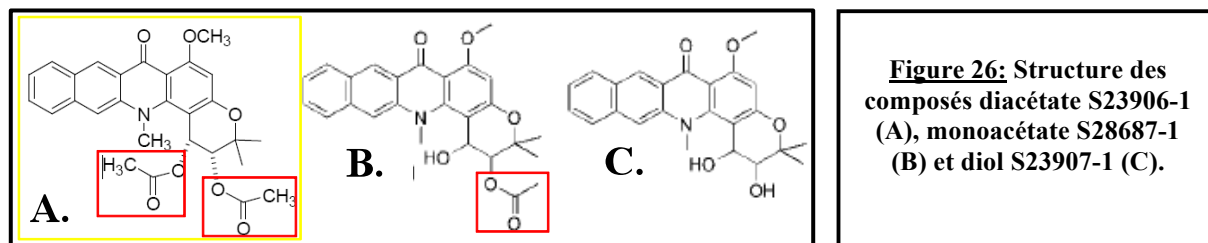


Figure 26: Structure des composés diacétate S23906-1 (A), monoacétate S28687-1 (B) et diol S23907-1 (C).

En effet, le S23906-1 a montré une efficacité et une activité antitumorale équivalente ou plus importante que celles des médicaments actuellement utilisés en clinique humaine (paclitaxel, topotécan, vinorelbine), ou sur les modèles de tumeurs solides humaines de poumon (A549 et NCI-H460), de colon (HCT-116 et HT-29) et de l'ovaire (IGROV1 et NIH:OVCAR-3) xénogreffées sur la souris immunodéprimée *nude* [109].

3.2.1. Mécanisme d'action cellulaire du S23906-1

Diverses études ont été entreprises afin de mieux comprendre le mécanisme d'action cellulaire et moléculaire de ce composé. Au niveau des cellules HT-29, on observe des effets sur le cycle cellulaire variables en fonction de la concentration en produit [110] : un arrêt réversible en phase G2/M du cycle cellulaire (0,1 à 1 μ M de S23906-1), puis un arrêt irréversible en phase S du cycle, suivi d'apoptose (2,5 à 5 μ M de S23906-1) et enfin un arrêt en phase G1/S (10 μ M de S23906-1). Le S23906-1 induit également l'apoptose des cellules leucémiques HL-60 via l'apparition de populations sub-G1 [111]. Cependant, aucune population de ce type n'est observée sur les cellules murines de mélanome B16 (cellules particulièrement résistantes aux agents cytotoxiques), pour lesquelles on observe cependant une accumulation en G2/M [111], tout comme obtenue sur les cellules HT-29 [110]. Il y aurait donc différentes machineries cellulaires mises en place selon la concentration en S23906-1 utilisée. Son action rapide et irréversible suggère notamment une accumulation du S23906-1 dans les cellules tumorales et des lésions peu ou pas réparées [110]. Une lignée cellulaire résistante à 500nM de S23906-1 (KB500) a été sélectionnée à partir de lignées KB3.1 sensibles pour faciliter l'étude du mécanisme d'action du S23906-1 [112]. Des tests de Comet Assay et de phosphorylation d'histones H2AX par ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et ATR (Ataxia telangiectasia mutated-RAD3 related) kinase ont montré que les

premiers adduits générés conduisaient à une formation plus importante de DSBs dans la lignée sensible au S23906-1 (13% de DSBs à 5µM pour KB3.1 contre 4% de DSBs pour KB500 après 4H) [112]. La formation de ces lésions active alors différentes machineries cellulaires.

3.2.1.1. Arrêt du cycle cellulaire (lignées HT-29, HeLa, KB3.1 et KB500)

La formation de DSBs génère l'activation de protéines kinase « checkpoint » Chk1 et Chk2 qui vont indirectement provoquer l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (et/ou G1/S) (figure 27) et ainsi permettre à la cellule de *réparer la lésion* ou alors *d'entrer en apoptose* si la lésion n'est pas réparable. Le S23906-1 induit en effet l'activation de Chk2 dans les lignées sensibles [112]. Mais contrairement à l'irofulven (autre alkylant du petit sillon), le S23906-1 active aussi Chk1 dans les cellules HeLa et HT-29 [113]. Une augmentation de la cycline E est observée au niveau des cellules HT-29 et KB3.1. Cependant, aucune augmentation de l'activité cycline E/Cdk2 n'est mesurée, en lien avec un blocage en phase G1 (figure 27) [110].

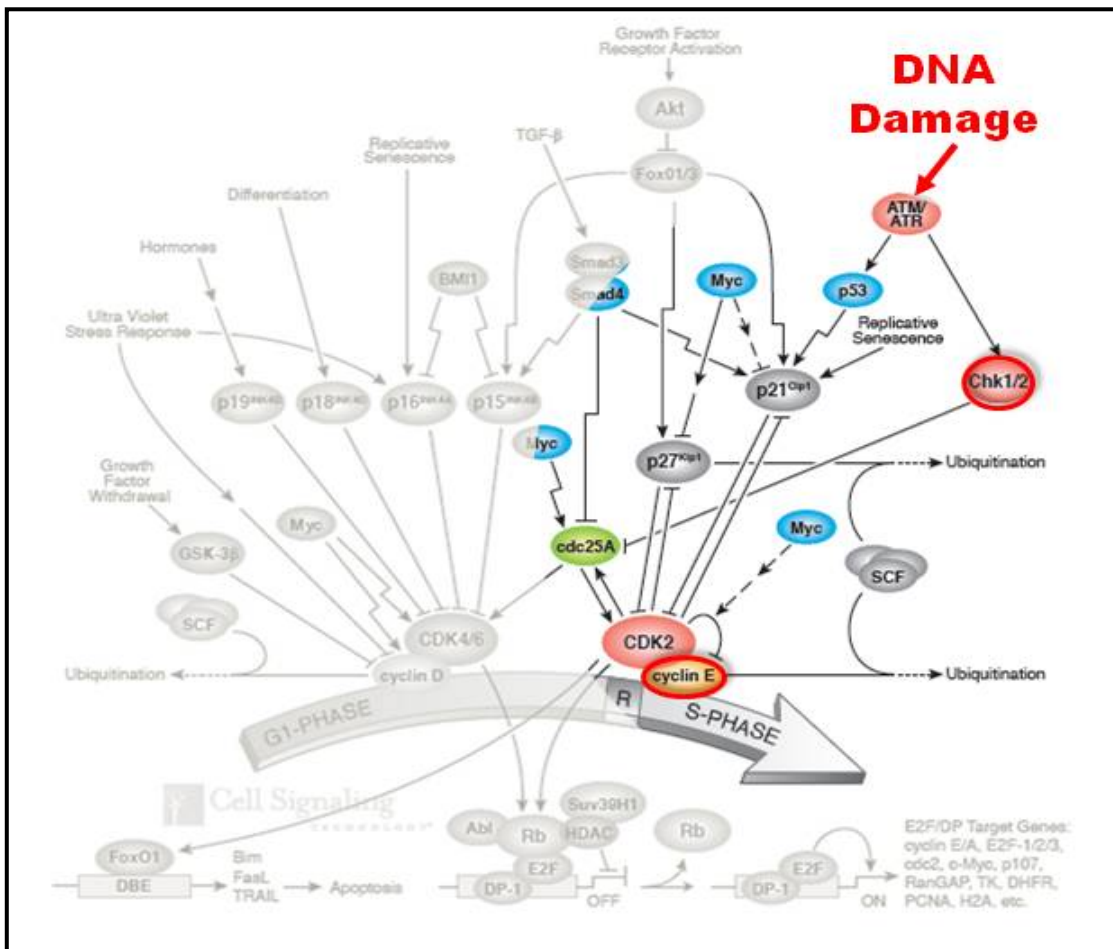


Figure 27: Modèle d'arrêt du cycle en phase G1/S suite au traitement des cellules au S23906-1 (d'après Cell Signaling Technology). L'induction de DSBs par le S23906-1 active Chk2 qui va ensuite indirectement inhiber le complexe cycline E/Cdk2.

L'implication de la cycline E dans l'activité cytotoxique du S23906-1 n'est pas claire pour ces lignées, d'autant plus que cette protéine n'est pas surexprimée dans les cellules KB500 [110]. L'utilisation de siRNA dirigé contre la cycline E1 démontre qu'elle n'est pas directement impliquée dans l'activité cytotoxique du S23906-1 [113].

3.2.1.2. Mort par « catastrophe mitotique » (lignées HT-29 et HeLa)

L'observation d'un arrêt réversible en phase G2/M émet l'hypothèse d'une entrée en mitose des cellules. Le S23906-1 induirait alors « une catastrophe mitotique », c'est à dire une entrée en mitose des cellules dont l'ADN n'est pas complètement répliqué. Une augmentation importante du taux de Cycline B1 a été observée après 1 à 4H de traitement des cellules HT-29 et HeLa, l'augmentation étant plus faible après 24H. Une forte quantité de cycline B1 (de 16H à 48H post-traitement) et une activité de Cdk1 qui augmente à partir de 32H a été observée, prouvant que les cellules entrent en mitose après un dommage à l'ADN (figure 28) [113].

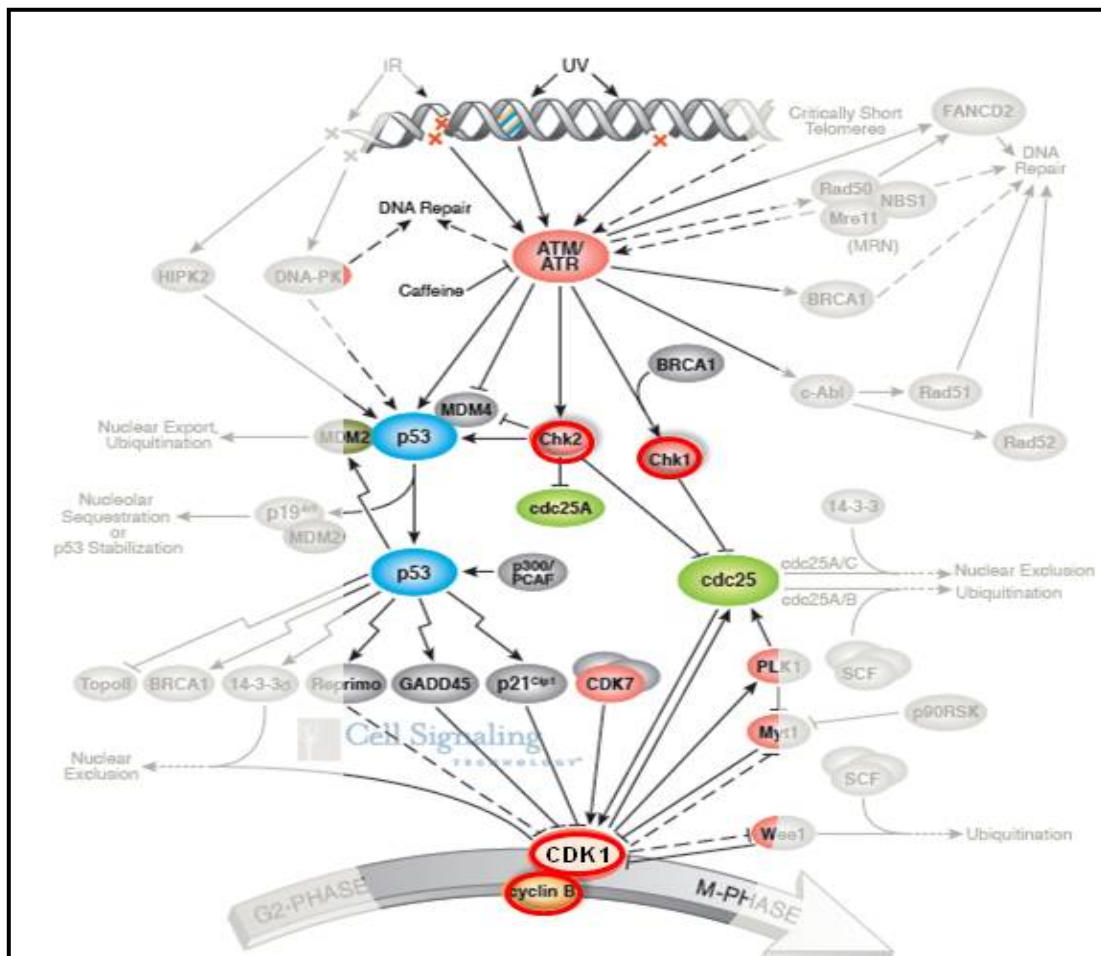


Figure 28: Modèle d'arrêt du cycle en phase G2/M suite au traitement des cellules au S23906-1 (d'après Cell Signaling Technology). L'induction de lésions à l'ADN par le S23906-1 active Chk2 qui va ensuite indirectement inhiber le complexe cycline B/Cdk1.

Des tests en microscopie de fluorescence utilisant un anticorps anti- γ H2AX ont montré des cellules en mitose contenant de l'ADN endommagé après 24H de traitement au S23906-1. Enfin, si l'on inhibe les « checkpoints » par la caféine, on augmente le nombre de cellules en mitose sous traitement au S23906-1, passant de 1,5% à 11,4% [113].

Le S23906-1 activerait donc dans un premier temps les « checkpoints » de dommage à l'ADN pour prévenir d'une « catastrophe mitotique », ce qui explique l'observation d'un arrêt du cycle en phase G2/M. Malgré cela, cette « catastrophe mitotique » a lieu même après 24H, c'est pourquoi on observe une reprise du cycle cellulaire et la réversibilité de l'arrêt en phase G2/M.

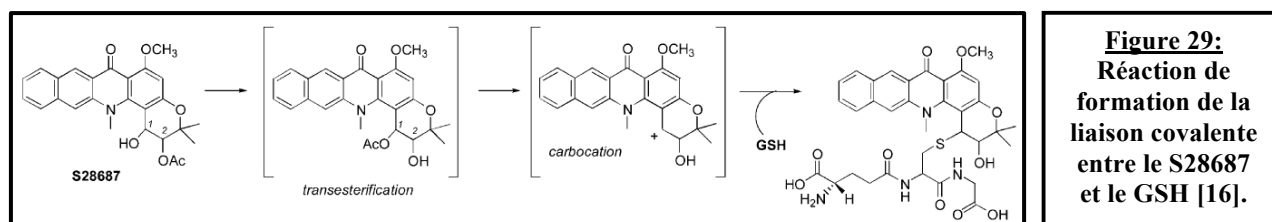
3.2.1.3. Mort par apoptose caspase-dépendante

(lignée HL-60 et cellules murines de mélanome B16)

Le composé S23906-1 induit l'apoptose des cellules HL-60 par une voie dépendante des caspases 3 et 7 mais ne montre pas d'effet sur l'expression de Bcl-2. L'apparition de populations sub-G1 (fonction de la concentration en S23906-1) est associée à l'observation d'importants changements du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_{mt}$) et à une production de ROS (espèces réactives à l'oxygène). Aucune de ces réponses moléculaires n'est observée sur les cellules murines de mélanome B16 [111].

3.2.2. Détoxification cellulaire du composé

Le S23906-1 étant un composé fortement électrophile, il présente la capacité d'interagir avec des radicaux nucléophiles retrouvés également au sein des acides nucléiques et des protéines. Par des expériences de biologie moléculaire classique (EI-MS, dichroïsme circulaire, fluorescence, retard en gel) mais aussi de biologie cellulaire (test MTS avec ou sans BSO (buthionine sulfoximine, inhibiteur de la synthèse de glutathion)), il a en effet été montré que le S23906-1 pouvait interagir avec le groupement thiol de la cystéine présente dans le glutathion. Certains dérivés du S23906-1 peuvent également interagir avec ce GSH, comme par exemple le S28687, mais pour lequel une transestérification est nécessaire (*figure 29*) [16, 114, 115].



La formation d'adduits GSH-dérivé benzoacronycine diminue l'action cytotoxique du composé contrairement à ce qui est observé avec la brostallicine [114]. Enfin, la résistance des cellules KB500 au S23906-1 n'est pas liée à une surexpression de la glycoprotéine-P (pompe d'efflux des drogues) [112].

3.2.3. L'ADN comme cible moléculaire du S23906-1

3.2.3.1. Interaction avec le petit sillon l'ADN

Il a été montré dans un premier temps que l'arrêt irréversible en phase S du cycle cellulaire résulterait d'une inhibition de la synthèse d'ADN (incubation des cellules avec 5 μ M pendant 4H) [110]. De manière intéressante, un profil similaire est retrouvé avec le dFdC (2'-deoxy-2' difluorodeoxycytidine), un analogue de la désoxycytidine (incorporation dans l'ADN, inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ADN polymérase α) [116, 117]. Le S23906-1 et ses dérivés (S28687-1 et S23907-1) (*figure 30*) présentent une structure plane qui leur permettrait en effet d'interagir avec l'ADN. Cependant, des études ont ensuite montré qu'aucune de ces trois molécules ne s'intercalait à l'ADN, ou n'inhibait la topoisomérase I [14]. De plus, le S23906-1 n'a pas non plus d'effet sur l'activité de la topoisomérase II, ni sur la polymérisation des tubulines [108].

Le S23906-1 est un composé électrophile fort, des expériences de retard en gel et de EI-MS ont montré que le S23906-1 et le S28687-1 interagissait de manière covalente avec l'ADN contrairement au composé S23907-1 [14] (*figure 30*). De plus, l'alkylation de l'ADN est une étape essentielle à l'activité cytotoxique du S23906-1 puisque le composé diol est inactif *in vitro* et *in vivo* [104, 118]. D'un point de vue réactionnel, l'interaction du S23906-1 à l'ADN se fait suite au départ du groupement acétate en position C1 et à l'apparition d'un intermédiaire réactif potentiel (le C1-carbocation) [119] (*figure 30*). Le S28687-1, quant à lui, doit subir une transestérification [16]. Le S23906-1 et le S28687-1 peuvent également alkyler de l'ADNsb, la forme mono-acétate étant cependant plus efficace que la forme diacétate [6]. Enfin, des expériences de retard en gel et de fluorescence ont révélé que le S23906-1 et le S28687-1 interagissaient, sous forme de mono-adduit [115], avec les guanines, et plus particulièrement avec l'azote en position 2 [14] (*figure 30*). Il faut noter que très peu de molécules induisent des mono-adduits au niveau du petit sillon de l'ADN, l'exemple le plus connu étant l'ET-743, qui a pourtant une structure très différente.

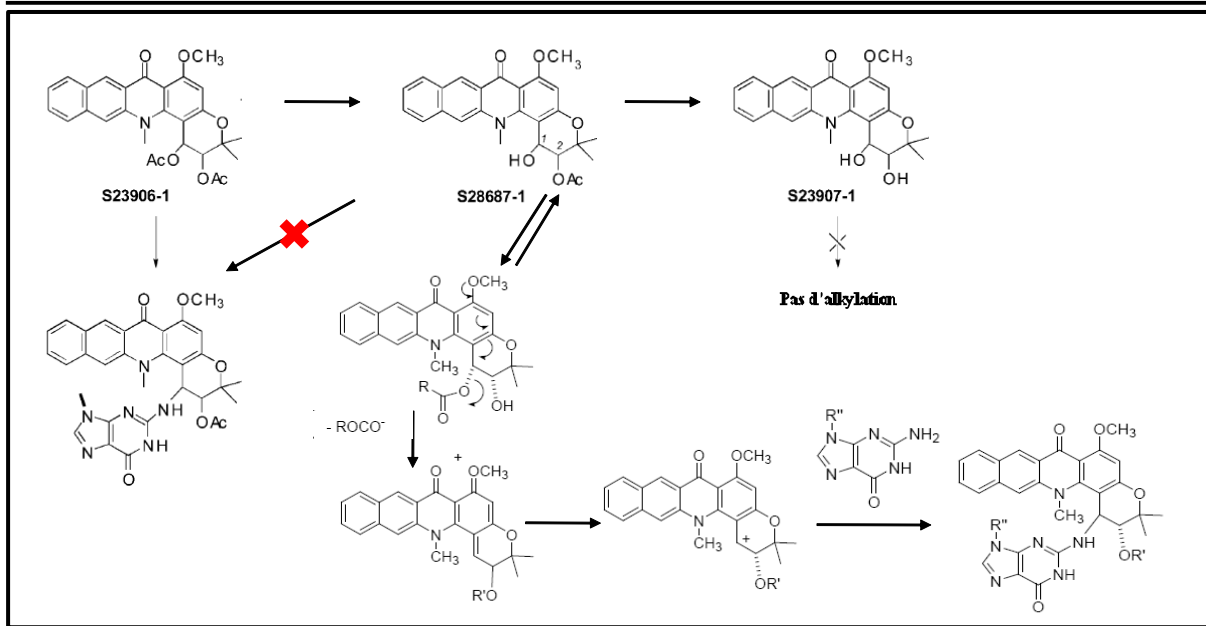


Figure 30: Structure de l'adduit S23906-1/N2 guanine et S28687-1/N2 guanine. Le composé S23907-1 n'interagit pas avec la guanine [14].

L'induction de DSBs est un phénomène qui a déjà été observé suite au recrutement soit de l'ADN polymérase au niveau de la fourche de réplication (ex : cisplatine [120]), soit suite au recrutement des topoisomérases I ou II. Dans le cas d'un traitement au S23906-1, l'apparition de DSBs (observées de manière plus précoce qu'avec le cisplatine) serait dépendante de la réplication puisque l'inhibition d'ADN polymérase par l'aphidicolin engendre une diminution de l'apparition de ces lésions. Cette hypothèse est validée *in vitro* puisque les γ H2AX (H2AX phosphorylé, indicateur de DSBs) sont observés en phase S du cycle des cellules HT-29 [112].

3.2.3.2. Réparation des lésions

De toutes les voies de réparation, la voie NER est la plus polyvalente en termes de reconnaissance des lésions de l'ADN [122] (figure 31). Par exemple, l'adduit ET-743/ADN est reconnu par la machinerie TC-NER (Transcription-Coupled NER), mais n'est pas reconnu par la machinerie GG-NER (Global Genomic NER) [123]. Cependant la lésion n'est pas enlevée mais convertie en un complexe stable entre l'adduit ET-743/ADN et l'endonucléase XPG [87]. A l'instar de l'empoisonnement par la topoisomérase I, ce complexe [adduit/protéine] forme une lésion encombrante qui entrera en collision avec le complexe de transcription (arrêt de la transcription), et avec la fourche de réplication (cassures de l'ADN) [124].

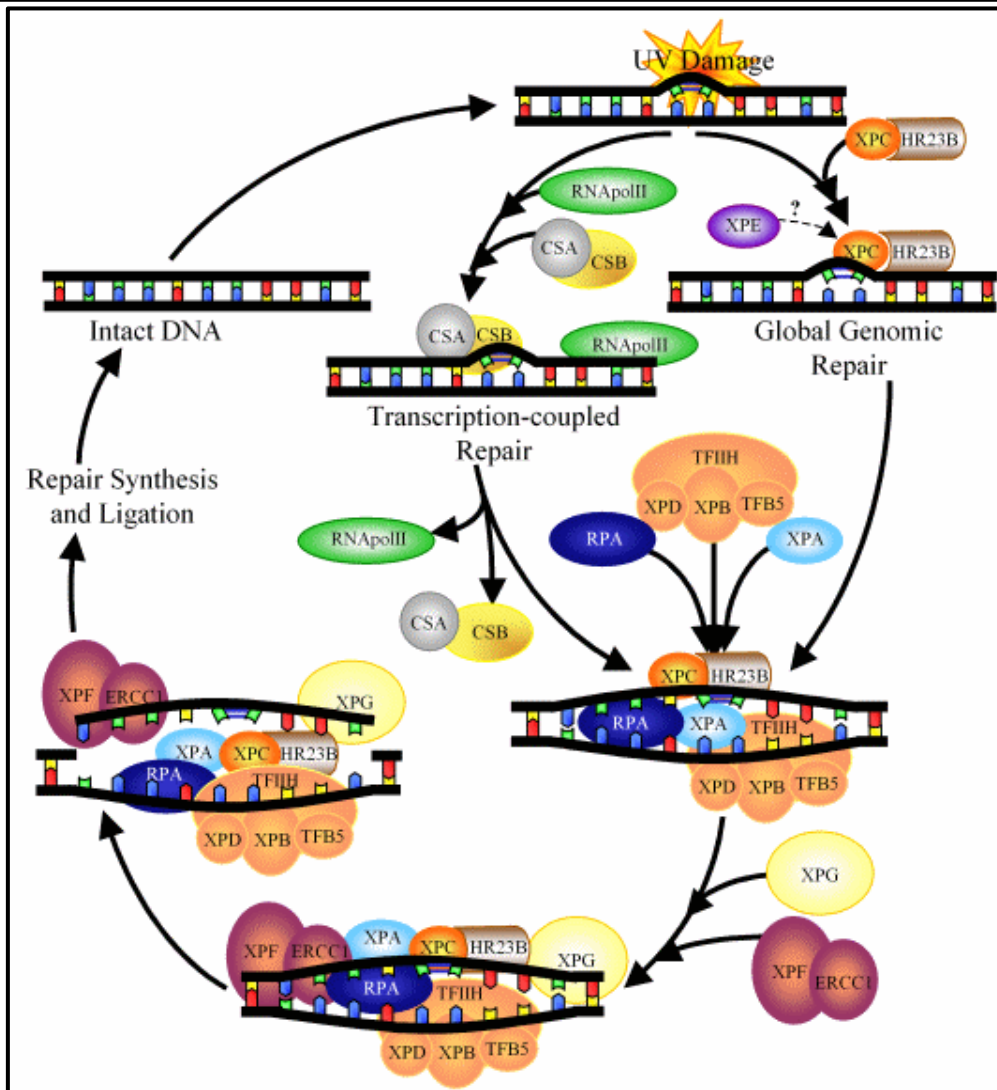


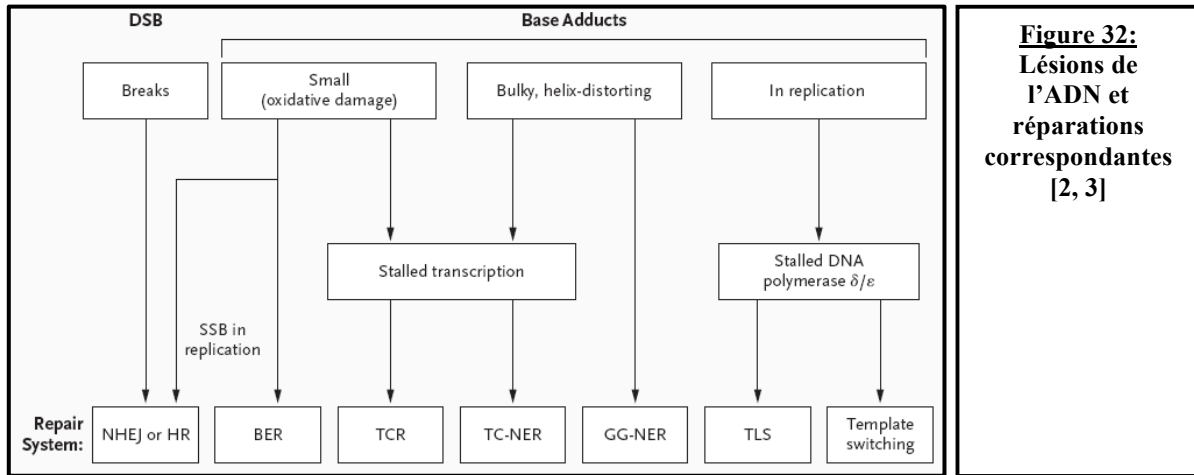
Figure 31: Sous-types de la voie de réparation NER

(http://ccr.coriell.org/sections/collections/nigms/ner_pathway.aspx?PgId=256).

Certaines lésions de l'ADN permettent le recrutement des protéines XPC/HR23B (GG-NER) ou alors le recrutement du complexe CSA/CSB suite à la détection de la lésion par l'ARN polymérase III (TC-NER). Ces deux voies conduisent à la fixation des autres protéines de la machinerie NER, permettant ainsi l'excision et le remplacement de la zone lésée par un fragment d'ADN nouvellement synthétisé.

Contrairement à l'ET-743, les adduits S23906-1/ADN sont reconnus par la machinerie TC-NER et par GG-NER [125]. La conformation de l'ADN aurait alors un impact sur la reconnaissance de l'adduit par les voies NER. En effet les cellules n'exprimant pas XPC et CSB sont très sensibles au S23906-1. Les cellules KB500 montrent aussi une activité de réparation TC-NER et GG-NER plus importante qu'au sein des cellules sensibles. Cependant, aucun changement du taux d'ERCC1 n'est observé dans les cellules résistantes. En effet, il a été montré que ERCC1 et XPF sont uniquement requis pour l'incision des crosslinks de l'ADN [125]. Le complexe n'interviendrait donc pas dans la réparation des lésions induites par le S23906-1.

Toutefois, la réparation de l'alkylation en elle-même apparaît comme identique dans les lignées KB3.1 et KB500 après 1H ou 24H de traitement (40% des lésions initiales par alkylation subsistent après 24H) [110, 112], ce qui ne serait pas le cas pour les DSBs [125]. Ce type de lésion de l'ADN peut alors être reconnu par d'autres voies de réparation (*figure 32*), telles que la voie Non Homologous End-Joining (NHEJ) ou Homologous Recombination (HR). De plus, le S23906-1 ne montrant pas d'effet sur l'expression de Bcl-2 [111], il n'inhiberait pas la voie NHEJ [126].



Ainsi ce ne serait pas l'alkylation en elle-même qui induirait un effet cytotoxique, mais plutôt le recrutement ou le non recrutement éventuel de protéines de la machinerie cellulaire au niveau de l'adduit ou alors une mauvaise réparation des DSBs dans les cellules sensibles.

3.2.3.3. Ouverture locale de la double hélice.

A la différence de l'ET-743, le S23906-1 ne stabilise pas la double hélice d'ADN mais au contraire la déstabilise [14]. Ainsi, des expériences de spectrométrie et de biochimie réalisées au sein du laboratoire ont montré que le S23906-1, le S28687-1 (dérivé monoacétate) et plus particulièrement le S29385-1 (dérivé bicarbamate) (*figure 33A*) déstabilisaient l'oligonucléotide XH [6]. L'apparition d'ADNsb a conduit également à tester la capacité de ces composés à alkyler l'ADNsb, les résultats se sont révélés positifs [6]. Ces dérivés benzoacronycine ont donc un mécanisme d'action bien particulier et différent des autres agents alkylant le petit sillon (*figure 33B*).

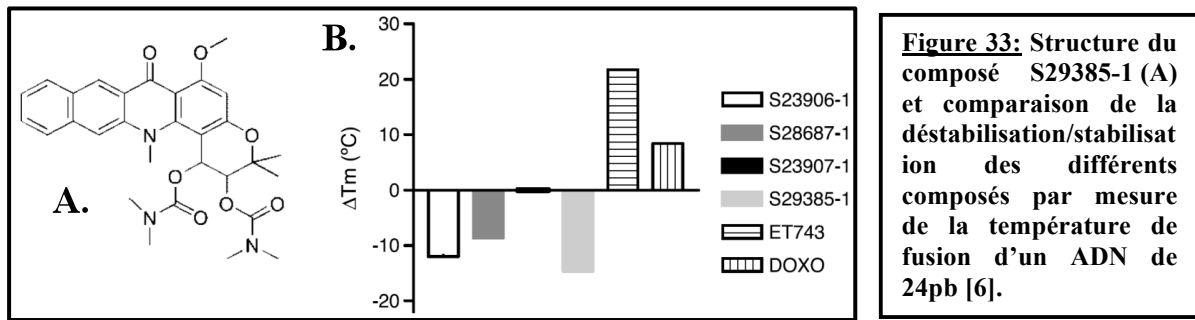


Figure 33: Structure du composé S29385-1 (A) et comparaison de la déstabilisation/stabilisation des différents composés par mesure de la température de fusion d'un ADN de 24pb [6].

3.3. Bilan mécanistique

Le S23906-1 induit une mort par « catastrophe mitotique » mais aussi caspase-dépendante comme bon nombre d'agents de chimiothérapie. Comme la plupart des agents alkylants, son interaction à l'ADN provoque des cassures doubles brins qui sont ici réplication-dépendantes et qui conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire. Les lésions pourront être réparées par différentes voies de réparation comme la voie NER.

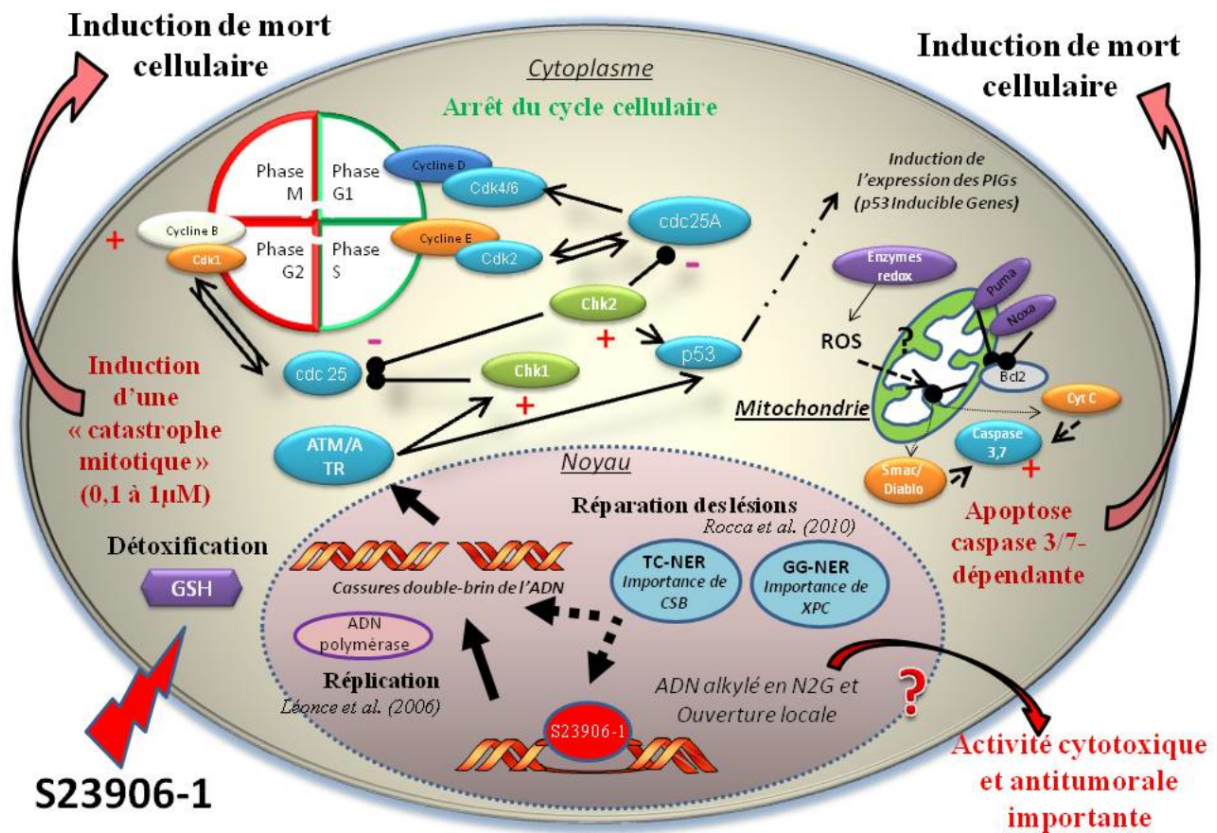


Figure 34: Schéma récapitulatif du mécanisme d'action du S23906-1

Le S23906-1 est pourtant plus efficace que ces différents agents dans plusieurs lignées cancéreuses humaines. En effet, très peu d'agent alkylant présente la capacité d'induction d'une ouverture locale de l'ADN. L'adduit formé permettrait ou empêcherait alors le recrutement de certaines protéines de la machinerie cellulaire ce qui induirait une mauvaise réparation de la lésion (observé dans les KB3.1 par rapport aux KB500) et/ou une modification de l'expression de protéines impliquées dans la prolifération ou la mort cellulaire.

3.4. Déstabilisation de la double hélice

Les liaisons hydrogènes qui stabilisent les deux brins d'ADN sont réversibles, les molécules qui interagissent avec l'ADN de manière covalente ou non peuvent alors désorganiser la double hélice de différentes manières. Cependant, à ce jour très peu de composés présentent cette capacité de déstabilisation de la double hélice. La revue Lenglet and David-Cordonnier située en annexe (Journal of Nucleic Acids, 2010) regroupe les agents connus qui présentent une activité de déstabilisation. Nous retrouvons notamment l'Acridine Orange (mono-intercalant), la Bisacridine A (bis-intercalent) ainsi que des agents alkylants comme certains dérivés platinés, ruthénium, psoralènes ou benzopyrènes, et la 4-Hydroxyequinelin. Le S23906-1 fait partie de cette minorité.

La déstabilisation de l'ADN pourra modifier le recrutement des protéines de réparation et de réplication de l'ADN mais aussi l'expression de certains gènes. La déstabilisation serait une « lésion » supplémentaire de l'ADN qui modifierait alors des processus cellulaires différents de ceux qui sont observés suite à l'apparition d'ICLs. L'étude du S23906-1 qui interagit au niveau du petit sillon en est d'autant plus intéressante.

3.5. Objectifs

Les résultats antitumoraux très prometteurs ont permis l'entrée du S23906-1 en essais cliniques de phase I-II en 2006, mais l'observation de thrombopénies chez plusieurs patients a motivé leur arrêt en 2007-2008. L'étude plus précise de son mécanisme d'action permettra ainsi de sélectionner des composés plus efficaces contournant ces toxicités.

Le mécanisme d'interaction à l'ADN du S23906-1 est très original, puisqu'il interagit avec le petit sillon, tout comme l'ET-743 mais il induit également une ouverture locale de la double hélice. Il est en effet le seul connu à ce jour capable de déstabiliser l'ADN en alkylant l'azote en position 2 des guanines. Les conséquences en termes de reconnaissance par les protéines de la machinerie cellulaire (réparation, transcription, réplication, structuration de la



chromatine, etc...) seraient alors différentes de celles s'opérant en présence de molécules fixées dans le grand sillon de l'ADN et/ou stabilisant la double hélice.

Les études entreprises sur les molécules ayant le **même site de liaison à l'ADN** (groupement amine exocyclique des guanines) mais le stabilisant, comme l'ET-743, peuvent alors se révéler très intéressantes pour nos recherches sur le S23906-1. Il est aussi essentiel de les comparer aux résultats obtenus avec les médicaments alkylants qui **déstabilisent l'ADN**, comme le cisplatine. Il faut rappeler que le recrutement et/ou l'inhibition de fixation de protéine(s) à ces types d'adduits influe sur l'activité cytotoxique du composé. En effet, l'ET-743 bloque la fixation de NF-Y, ce qui empêche l'expression de la glycoprotéine P, et trappe la protéine XPG, ce qui inhibe la réparation de la lésion par la machinerie NER. La distorsion de l'ADN induite par le cisplatine favorise quant à elle la fixation de la protéine HMG-B1 (High Mobility Group-B1) ou p53, ce qui aboutit également à un défaut de réparation de la lésion.

Les objectifs majeurs de ce travail sont donc de déterminer quelles protéines sont spécifiquement impliquées dans la reconnaissance directe des adduits S23906-1/ADN de manière à aborder la compréhension du mécanisme d'action de ce nouvel agent chimiothérapeutique et de débiter la cascade des événements signalétiques qui aboutissent à la mort de la cellule tumorale traitée par cette molécule.

Nos études ayant mis en évidence la GAPDH comme protéine interagissant directement avec l'adduit S23906-1/ADN, nous nous sommes interrogés sur les différentes fonctions de cette protéine.

4. GAPDH

La GAPDH (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a été originellement identifiée comme une protéine impliquée dans la glycolyse. Elle est également connue des biologistes moléculaires pour être exprimée de manière « ubiquitaire » ; elle est alors utilisée comme normalisateur d'expression tant protéique (western-blot) qu'ARNm (Q-RT-PCR).

La GAPDH présente une localisation cellulaire très variée en lien avec ses multiples fonctions [127] qui conduiront soit au maintien de la prolifération, soit à l'induction de l'apoptose dans différents types cellulaires (sains, cancéreux ou neurodégénératifs). Au niveau du cytoplasme, la GAPDH est retrouvée à la fois associée aux mitochondries, au système réticulum endoplasmique/golgi/vésicules, aux microtubules et aux membranes

cellulaires. Au niveau nucléaire, la GAPDH interagit avec l'ADN double brin (ADNdb) ou simple brin (ADNsb), les ARNm et ARNt mais aussi certains adduits ou bases modifiées de l'ADN.

4.1. Expression et structures de la GAPDH

4.1.1. Gène(s) de la GAPDH

Malgré son rôle pléiotrope, un seul gène « actif » serait à l'origine de la synthèse de la GAPDH au sein des différentes cellules humaines. Ce gène est situé sur le chromosome 12, proche du gène de la LDH-B (lactate déshydrogénase B) [128]. Néanmoins 24 « pseudogènes » ont été détectés dans le génome humain, notamment sur la région p21-p11 du chromosome X, alors qu'il y en a plus de 200 pour le génome de rat [129]. Un seul type d'ARNm a été identifié dans différentes lignées tissulaires de rat [130, 131]. Plus récemment, une équipe a montré la présence d'un deuxième gène actif de la GAPDH qui code pour une protéine de 44,5 KDa (68,3% d'identité avec la première). Le gène de cette GAPDH-2 est localisé sur le chromosome 19, mais est exprimé uniquement dans les cellules spermatogénique [132]. Puisqu'elle n'est pas exprimée de manière ubiquitaire, elle est peu étudiée, notamment dans le cadre de la mort cellulaire.

La diversité des fonctions de la GAPDH ne serait donc pas le résultat d'un épissage alternatif mais plutôt la conséquence de variation du taux d'expression et de modifications post-traductionnelles.

4.1.2. Régulation de l'expression de la GAPDH

L'expression de la GAPDH peut varier entre des lignées cellulaires d'origine tissulaire différente de rat [131] et peut être prolifération-dépendante dans les cellules humaines saines [133, 134]. Par exemple, dans certains fibroblastes, le taux de GAPDH est dépendant du cycle cellulaire, avec une expression qui augmente fortement (ARNm et protéine) avant et pendant la synthèse d'ADN, mais qui diminue ensuite en fin de phase S [134]. Il faut noter que la durée de demi-vie de la protéine nouvellement synthétisée suite à un divers stimuli est très courte (1H) [134], alors qu'elle varie habituellement entre 33 et 43H [135].

Des études sur lignées tumorales de prostate humaine ont aussi montré une corrélation entre la quantité de GAPDH et le grade tumoral [136]. La GAPDH est également surexprimée (et localisée dans le noyau) dans les cellules granuleuses cérébelleuses et dans les neurones

corticaux qui entrent en apoptose suite au vieillissement des cellules, ou encore au traitement des cellules avec l'AraC, à une déplétion en sérum ou en K⁺ du milieu de culture [137-140].

Il est à noter que les ADNc de la GAPDH des cellules cérébelleuses saines et apoptotiques de rat sont identiques [141]. Pourtant, la surexpression de ce même ADNc (couplé ou non à une GFP) par transfection dans les lignées COS-7, PC12, HEK et COS-1, induit l'apoptose des cellules (la translocation nucléaire observée précède les dommages à l'ADN) [141, 142]. L'étude de la région promotrice des cellules traitées par AraC a en effet mis en évidence une région pro-apoptotique (de -154 à -84pb) [143] contenant trois sites potentiels de fixation de p53. Le traitement à l'AraC active p53 qui active à son tour l'expression de Bax et de la GAPDH [137, 144]. Réciproquement, un traitement des cellules neuronales avec Cognex[®] (un anti-apoptotique utilisé pour limiter l'évolution de la maladie d'Alzheimer) diminue l'expression de la GAPDH, empêche sa translocation nucléaire [145] et l'entrée en apoptose des cellules traitées avec l'AraC et ceci de manière dose-dépendante [143].

Le taux d'expression de la GAPDH varie également suite à de multiples autres stimuli, les conséquences en seront également variées (*tableau 2*).

Stimuli	Expression	Type cellulaire	Mécanisme proposé	Références
Hypoxie	Surexpression (=développement du cancer)	cellules endothéliales	HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1) interagirait avec une région du promoteur (de -130 à -112pb) du gène de la GAPDH	[146, 147]
	Pas de surexpression	A549, HT-29, HCT-116	-	[148]
1,25 dihydroxyvitamine D^a	Surexpression	BT-20 et MCF-7 (épithéliales mammaires malignes)	nd	[149]
Infection persistante par HPV^b	Surexpression (=développement du cancer du col de l'utérus)	cellules de cancer de l'utérus HPV-positif	nd	[150]
Infection par virus Vaccina	Surexpression	monocytes adhérents humain	Localisation nucléaire suite à l'infection	[151]
Insuline	Surexpression	cellules H35 (Hépatome)	Fixation d'IREA-BP (protéine de réponse à l'insuline) à la région promotrice (-480 à -435pb) du gène de la GAPDH dans un vecteur rapporteur	[152, 153]
Glutamine^c	Surexpression	cellules HepG2	Contrôle de l'expression de la GAPDH par le Gln se fait au niveau de la région (de -126 à -118pb).	[154]
Hyperpression	Surexpression	cellules de ganglion rétinien (RGC-5),	Localisation nucléaire suite à l'hyperpression	[155]

^a stéroïde produit au niveau du tubule proximal (rein) en réponse à différents stimuli comme une hypophosphatémie, une hyperparathyroïdie ou des faibles apports alimentaires en calcium
^b Human PapilloVirus
^c régule l'anabolisme du foie, comme l'insuline pour les tissus périphériques
nd : non déterminé

Tableau 2: Variation du taux d'expression de la GAPDH suite à différents stimuli.

Ainsi, le taux d'expression de la GAPDH peut varier entre des lignées cellulaires d'origine tissulaire différente, mais aussi au sein d'une même cellule en fonction du stade de prolifération, du nombre de divisions cellulaires déjà effectuées ou en fonction de l'environnement extracellulaire. Depuis longtemps, la GAPDH est utilisée comme normalisateur dans l'étude de l'expression des gènes. Compte tenu des différentes études illustrées ci-dessus, ce gène « contrôle » devrait être testé pour chacune des lignées étudiées. Par exemple, ces tests ont déjà été réalisés pour l'étude des gènes impliqués dans l'insuffisance cardiaque humaine [156]. Enfin les mécanismes par lesquels le taux de GAPDH influe sur différentes voies signalétiques comme l'induction de l'apoptose ou à l'inverse la prolifération des cellules ne sont pas encore bien connus.

4.1.3. Structure et activité glycolytique de l'enzyme

La GAPDH est une protéine composée d'une chaîne polypeptidique de 335 acides aminés (figure 35).

<i>Human Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (P04406 GAPDH) :</i>				
<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>
MGKVKVGVNG	FGRIGRLVTR	AAFNSGKVDI	VAINDPFIDL	NYMVYMFQYD
<u>60</u>	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>
STHGKFHGTV	KAENGKLVIN	GNPITIFQER	DPSKIKWGDA	GAEYVVESTG
<u>110</u>	<u>120</u>	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>
VFTTMEKAGA	HLQGGAKRVI	ISAPSADAPM	FVMGVNHEKY	DNSLKIISNA
<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>	<u>190</u>	<u>200</u>
SCTTNCLAPL	AKVIHDNFGI	VEGLMTTVHA	ITATQKTVDG	PSGKLWRDGR
<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>	<u>250</u>
GALQNIIPAS	TGAAKAVGKV	IPELNGKLTG	MAFRVPTANV	SVVDLTCRLE
<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
KPAKYDDIKK	VVKQASEGPL	KGILGYTEHQ	VVSSDFNSDT	HSSTFDAGAG
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>		
IALNDHFVKL	ISWYDNEFGY	SNRVVDLMAH	MASKE	

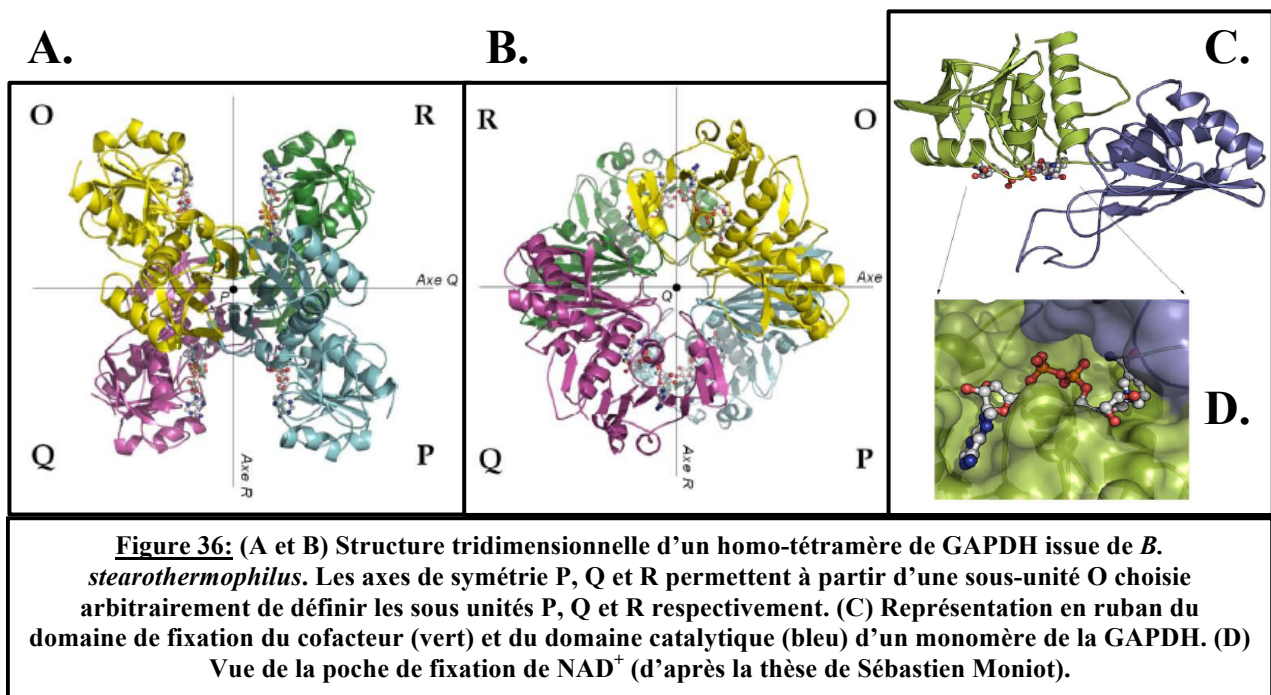
Figure 35: Séquence peptidique de la GAPDH humaine, (d'après UniProtKB/Swiss-Prot).

L'enzyme glycolytique (EC1.2.1.12) est isolée sous forme d'homo-tétramère [127] et arrangée selon un système de coordonnées orthogonales d'axes *P*, *Q* et *R*. Chaque sous-unité présente (exemple de *Bacillus stearothermophilus* [157]) :

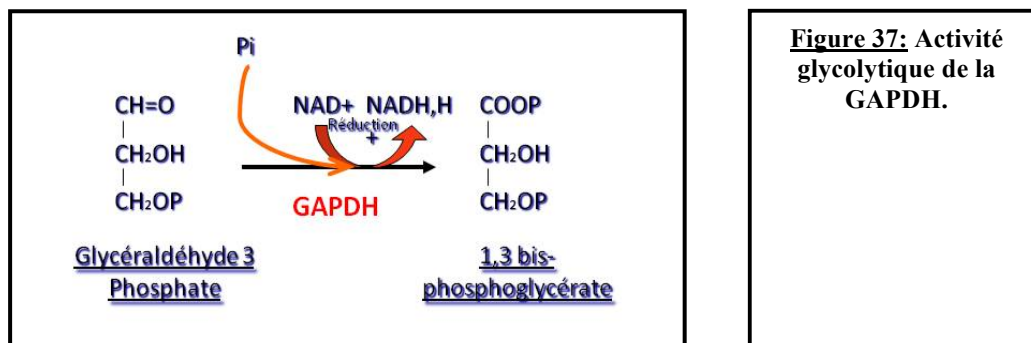
- un domaine N-terminal de liaison à une molécule de NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) (résidus 1-148 et 312-333, constitué de plusieurs structures α/β). Ce motif β - α - β - α - β , nommé aussi « Rossman Fold » est souvent retrouvé dans les protéines à activité déshydrogénase [158, 159].

- un domaine catalytique en C-terminal (résidus 149-311, constitué de 8 feuillets β parallèles reliés par des coudes ou des petites hélices α) [160] (figure 36).





La GAPDH catalyse simultanément l'oxydation et la phosphorylation de la glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en 1,3-biphosphoglycérate, en utilisant le NAD⁺ comme accepteur d'électrons (figure 37).



Les acides aminés importants pour la fonction glycolytique sont la Cys¹⁵² et l'His¹⁷⁹ [127] : l'His¹⁷⁹ interagit via des ponts hydrogènes avec la Cys¹⁵² [161]. La Val²⁴⁰ est caractéristique de la GAPDH, puisqu'elle forme un pont hydrogène avec l'Asn³¹⁶ lui permettant d'interagir avec le noyau nicotinamine du NAD⁺ [160].

La masse de la GAPDH peut varier de 34 à 54KDa et le pI (point isoélectrique) de 7,0 à 8,7. Nous verrons en effet qu'elle peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles qui lui permettront de se localiser dans différents compartiments cellulaires [162].

Enfin, de manière générale, la structure des protéines varie de manière plus ou moins importante entre les espèces. Ainsi, l'antibiotique pentanelactone interagit avec la GAPDH de muscle de lapin [163], mais pas avec la GAPDH de *Streptomyces arena*, l'organisme qui

produit cette molécule [164]. Des études ont notamment montré des différences structurales entre la GAPDH de foie humain et de *Trypanosoma cruzi*, cette particularité peut être utilisée à des fins anti-parasitaires. Des dérivés de coumarines sont notamment synthétisés pour inhiber sélectivement l'activité glycolytique de la GAPDH du parasite [165].

Il y a donc un intérêt croissant pour l'étude de la GAPDH dans le cadre du développement de médicaments anti-parasitaires. La détermination de la structure de la GAPDH est donc une contribution importante pour le design de drogue basé sur la structure des cibles.

4.1.4. Modifications post-traductionnelles de la GAPDH

L'étude des différentes modifications post-traductionnelles de la GAPDH a permis d'appréhender le fonctionnement de cette GAPDH aux multiples fonctions. L'équipe de Kong-Joo Lee a notamment contribué à l'identification de nombreuses modifications post-traductionnelles peu représentées qui ont lieu suite au traitement au peroxyde d'hydrogène (ou H₂O₂) des cellules HEK293T [166] (figure 38).

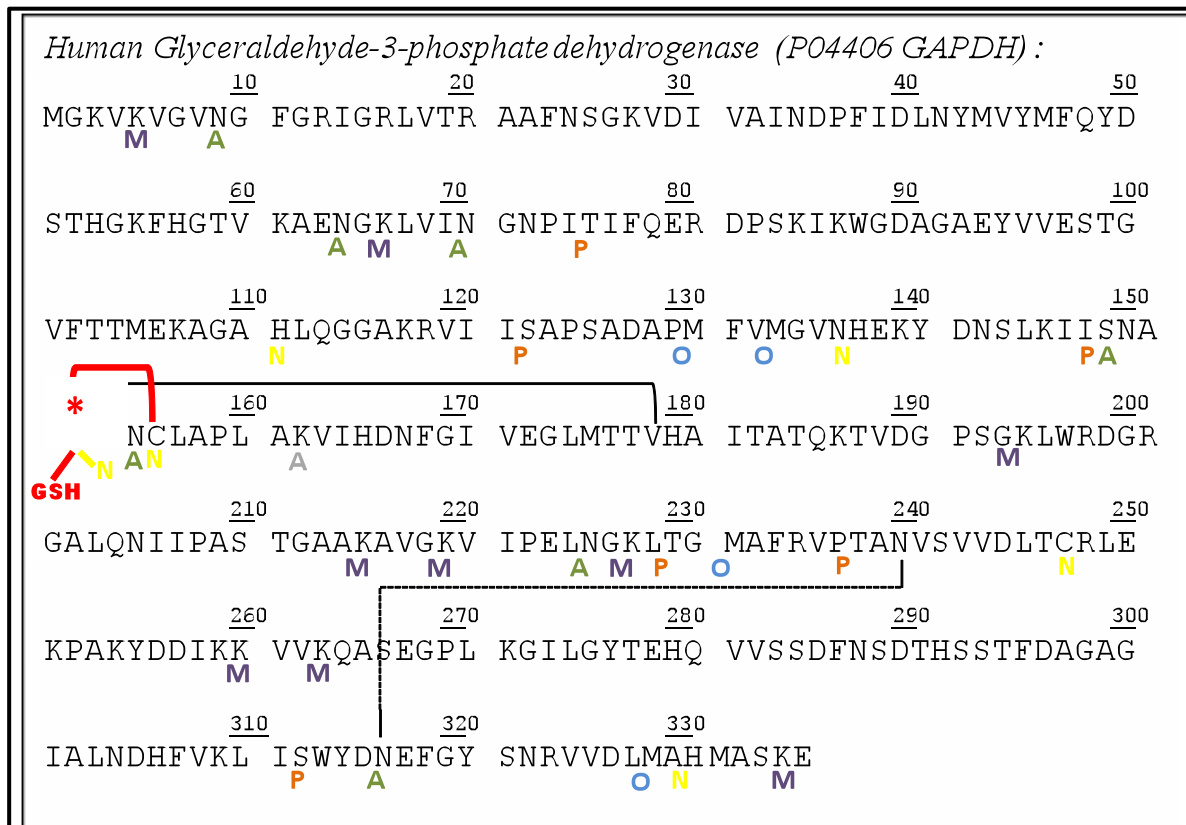


Figure 38: Localisation de différentes modifications post-traductionnelles de la GAPDH. La Cys¹⁵² forme des ponts avec l'His¹⁸⁹ et la Cys¹⁵⁶, elle interagit également avec la Cys du GSH. La Cys¹⁵² subit plusieurs autres modifications (voir texte).

M : diméthylation ; A : désamination ; P : phosphorylation ; O : oxydation ; N : nitroalkylation ; Ac : acétylation

La GAPDH peut être phosphorylée par plusieurs protéines kinases : protéine kinase C [167], epidermal-growth-factor kinase [168] et Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II [169]. En présence d'H₂O₂, les groupements thiols s'oxydent très facilement. La Cys¹⁵² impliquée dans la fonction glycolytique de la protéine forme un pont disulfure avec la Cys¹⁵⁶ [166] ou avec une cystéine du glutathion (le GSH fait changer le pI de la GAPDH d'érythrocyte humain de 8,1 à 6,9 [127]) [170-173].

La Cys¹⁵² peut également être transformée en acide cystéique ou en sérine [166], et la Cys²⁴⁷ en acide cystéique ou en déhydroalanine [166]. L'oxide nitrique (NO) induit une S-nitrosylation de la Cys¹⁵² [174-176] qui pourra être hydrolysée en acide sulfénique (-SOH) puis oxydée séquentiellement en acide sulfinique (-SO₂H) et en acide sulfonique (-SO₃H) [177]. La GAPDH peut également être nitro-alkylée en Cys^{152, 156 et 247} et en His^{111, 137, 330} par des dérivés nitroalkènes (« Acide Gras insaturé + NO », médiateurs endogènes anti-inflammatoire) [4]. Elle peut aussi être poly(ADP-ribosylée) par la PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) [178, 179].

Enfin, la GAPDH peut interagir avec diverses petites molécules qui ont des fonctions anti-tumorales ou anti-neurodégénératives :

➤ La GAPDH interagit directement via 2 résidus Cys, 2 His ou 1 Lys avec le produit de peroxydation des lipides: le 4-hydroxy-2-nonenal (ou 4-HNE) [180]. Cette molécule électrophile induit des adduits de l'ADN en N2 des guanines dans les cellules dont la voie de réparation est ou non NER fonctionnelle [181]. Il s'en suit une dégradation de cette GAPDH modifiée par une « giant serine protease » [182].

➤ Le 3BrPA (pyruvic acid analog 3-bromopyruvate) est un agent alkylant connu pour induire la mort de cellules cancéreuses en inhibant la glycolyse via la voie des caspases. En utilisant du 3BrPA radiomarké et une électrophorèse bidimensionnelle, une équipe a mis en évidence la GAPDH comme cible protéique principale dans différentes lignées de carcinome hépatocellulaire humain. La GAPDH pyruvylée ne présente alors plus d'activité glycolytique [183].

➤ Le CPGP3466, un composé en phase II d'essai clinique pour le traitement de la maladie de Parkinson, se lie également à la GAPDH, ce qui empêcherait l'apoptose des cellules et réduirait la mort neuronale et non-neuronale [145].

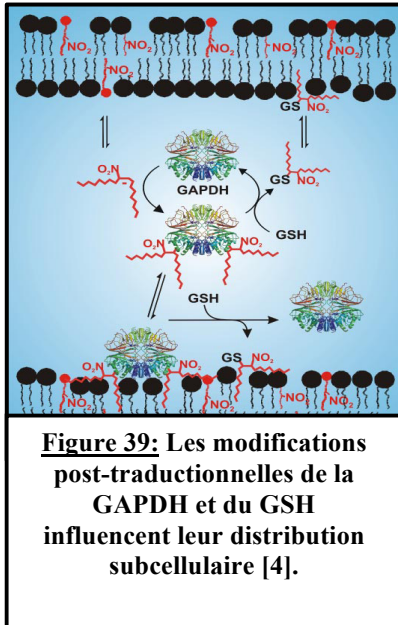
Les isoformes de GAPDH seront, comme pour l'expression de l'ARNm, différentes entre lignées cellulaires et entre des cellules saines et anormales [136], mais aussi différent pour une même cellule en fonction des stimuli extérieurs. Suite aux modifications post-traductionnelles, la GAPDH pourra être convertie en forme non native (mono- ou homomérique), interagir avec des composants moléculaires dans différents compartiments cellulaires, et ainsi jouer un rôle dans le maintien de la prolifération cellulaire ou l'induction de l'apoptose des cellules normales ou pathologiques, et cela en conservant ou non son activité glycolytique. Les différentes fonctions de la GAPDH sont développées dans les paragraphes suivants.

4.2. Localisation et fonctions extracellulaires

L'IPSF-II α (Immunoglobulin production stimulating factor-II α) est retrouvée au niveau du milieu extracellulaire des cellules Namalwa de lymphome de Burkitt et augmente la production d'IgM dans des hybridomes humain/humain et souris/souris. L'IPSF-2 α est composée d'une chaîne polypeptidique de 40KDa et de deux chaînes de 36KDa qui correspondent à deux GAPDH. L'activité IPSF de la GAPDH a également été retrouvée au sein du milieu de culture de différentes lignées cellulaires de mammifères (COS-7, HEK293, MCF-7, PC12 et neuro-2a). Elle module alors les interactions cellules/cellules ou cellules/matrice en interagissant avec la membrane par son résidu Cys¹⁵². Elle agit ainsi comme un facteur « anti-adhésion », sans modifier la prolifération cellulaire [184].

4.3. Localisation et fonctions cytoplasmiques

4.3.1. Interaction avec la membrane plasmique, échanges d'informations avec le milieu extracellulaire



L'interaction de la GAPDH à la membrane plasmique a été observée pour la première fois dans les années 70, cependant le rôle de cette GAPDH membranaire n'est pas toujours très clair. Dans les cellules érythrocytaires humaines, la GAPDH est retrouvée associée à la membrane à hauteur de 60-70% où deux molécules de GAPDH interagissent avec une molécule Band3 (une protéine échangeuse d'ions) [127]. Dans les globules rouges humains, les nitroalkènes permettent aussi à la GAPDH et au GSH d'interagir directement avec la membrane [4].

La GAPDH présente également une activité fusiogénique (endocytose) au sein de cellules CHO [127, 185] et de muscle de lapin alors que ce n'est pas le cas de la GAPDH érythrocytaire humaine [127]. La protéine est également localisée au niveau des membranes de macrophages bovins, où, comme les protéines HSP90 et HSP70, elle interagit directement avec le domaine cytoplasmique de MSR (Macrophage Scavenger Receptor), ce qui affecte l'internalisation, l'expression à la surface membranaire et la transduction du signal [186]. Elle est aussi retrouvée à la surface des macrophages humains et murins, de manière dépendante de la quantité de fer extracellulaire, jouant un rôle de récepteur de transferrines [187].

La GAPDH serait donc impliquée dans de nombreuses fonctions de la membrane plasmique : échange d'ions, de micro- ou macromolécules avec le milieu extracellulaire et reconnaissance/adhésion des cellules entre elles.

4.3.2. Interaction avec les tubulines, interface RE-golgi

La tubuline est une protéine du cytosquelette présente dans toutes les cellules de mammifères. Sa polymérisation/dépolymérisation est une fonction essentielle à la prolifération et l'organisation structurale de la cellule. Dans les années 80, des études ont montré que la GAPDH interagissait sous forme dimérique ou tétramérique avec les microtubules, mais que seul le tétramère avait une activité de polymérisation. En effet, en présence d'ATP (qui facilite la dissociation de la forme tétramérique de la GAPDH en forme monomérique), l'assemblage des microtubules est interrompu [127]. Cette activité de polymérisation des microtubules par la GAPDH est observée dans les cellules cancéreuses de colon humain [127].

La GAPDH est impliquée également dans le transport vésiculaire entre le Réticulum Endoplasmique et le complexe Golgien. En effet, suite au recrutement au niveau de l'amas vésiculaire de Rab2 (petite GTPase impliquée dans la formation de vésicules) dans les cellules rénales de rat, la GAPDH est phosphorylée par la protéine kinase C α [188] ; elle permet alors la fixation des microtubules aux membranes de ces vésicules [189]. Rab2 se fixe enfin aux microtubules et recrute la protéine motrice : la dynéine [190].

Il faut noter également qu'après traitement de cellules de neuroblastome avec la 6-hydroxydopamine, la GAPDH se localise d'abord dans le Golgi puis dans le noyau [191].

4.3.3. Localisation mitochondriale, rôle anti- ou pro-apoptotique

La GAPDH est transloquée dans les mitochondries de cellules HeLa et HEK293, suite au traitement pendant 6H avec la staurosporine (250 nM) (inhibiteur de protéine kinase), l'étoposide (250 μ M) (poison de la topoisomérase II), la lonidamine (500 μ M) (drogue mitochondriotoxique) ou suite à une déplétion en sérum (associée à une translocation nucléaire de la GAPDH dans les cellules HEK293), ceci de manière dépendante de l'expression de Bcl-2. En effet, la GAPDH interagit avec VDAC (Voltage-dependent anion channel, composant du PTPC (permeability transition pore complex)) et induit une perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) (*figure 40*) [17]. La GAPDH provoque alors la libération de AIF (Apoptosis Inducing Factor) et du Cyt *c* (Cytochrome *c*) qui vont à leur tour activer les caspases (*figure 40*). Toutefois, à la différence du traitement par les ions Ca²⁺, les mitochondries conservent une forme ovoïde [17].

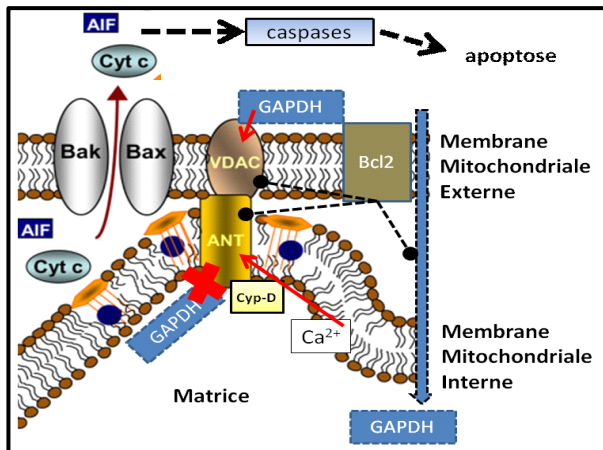


Figure 40: Interaction de la GAPDH au niveau du complexe de pore de transition (PTPC) composé de VDAC, ANT et Cyp-D, d'après [12]. La GAPDH n'interagit pas avec ANT (Adenine Nucleotide Translocator) mais induit une perméabilisation de la membrane mitochondriale via son association avec VDAC [17]. La GAPDH induit alors, tout comme les ions Ca^{2+} , la libération de AIF et du Cyt *c* qui vont à leur tour activer les caspases et induire l'apoptose des cellules.

Il existe également une voie de mort cellulaire dépendante de la MMP mais indépendante des caspases (CICD). La GAPDH protège en effet les cellules HeLa de la CICD induite par un traitement à la staurosporine, l'étoposide ou de l'Actinomycine D, en augmentant la glycolyse pour compenser la diminution du taux d'ATP [8, 192].

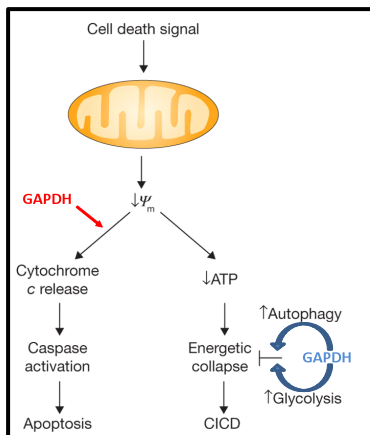


Figure 41: Rôle pro- et anti-apoptotique de la GAPDH, d'après [8].

La GAPDH est ainsi impliquée dans le contrôle de la voie intrinsèque de mort cellulaire caspase-dépendante, mais elle exerce aussi des fonctions anti-apoptotiques. Cependant, la raison pour laquelle la GAPDH exerce soit l'une soit l'autre fonction n'est pas connue (figure 41).

4.3.4. Activité kinasique de la GAPDH, implication dans la transmission de signaux et dans l'infection des cellules

In vitro, en présence de Mg^{2+} et d'ATP radiomarqué la GAPDH de muscle de lapin présente une capacité d'autophosphorylation [193]. Elle peut également phosphoryler d'autres protéines comme preS1-BP35 (une protéine de l'enveloppe du virus de l'Hépatite A) [194], ou alors jouer un rôle dans les signaux de phospho-relai de la voie MAPK [195].

4.4. Interface Cytoplasme/Noyau

4.4.1. Régulation de l'expression de certains ARN, implication dans l'inflammation, l'infection et l'export d'ARNt

La synthèse de protéines est quelques fois régulée par un processus de stabilisation/déstabilisation de l'ARNm. Ces ARNm présentent en effet des éléments riches en bases AU en 3' de la région non traduite qui peuvent être déstabilisés par des protéines du cytoplasme. Dans les cellules endothéliales, la GAPDH S-glutathionylée en position Cys¹⁵² interagit et déstabilise l'ARNm d'ET-1 (endothelial-derived vasoconstrictor endothelin-1) [196]. La GAPDH fait partie du complexe GAIT (IFN- γ -activated inhibitor of translation) qui est activé suite au traitement de cellules myéloïdes avec de l'IFN- γ , et diminue ainsi la traduction de protéines impliquées dans l'inflammation [197].

La GAPDH peut aussi interagir avec des ARNm viraux en 3'-UTR (virus parainfluenza de type 3 [198] et virus encephalitis japonais [199]) ou en 5'-UTR (virus de l'hépatite A [200]). Elle se fixe également au PRE (post-transcriptional regulatory *cis*-element) de l'ARNm du virus de l'hépatite B. Ce complexe est notamment retrouvé au niveau du noyau des cellules infectées [201]. La GAPDH présentera alors un rôle pathogène [199] ou anti-infectieux [202]. La GAPDH permet aussi le transport d'ARNt du noyau vers le cytoplasme puisqu'un ARNt muté qui ne peut plus interagir avec la GAPDH ne présente plus la possibilité d'être exporté du noyau vers le cytoplasme dans les ovocytes de grenouille [203]. Enfin, le domaine de fixation du NAD⁺ serait impliqué dans l'interaction à l'ARN [127, 203, 204].

4.4.2. Translocation nucléaire de la GAPDH

Dans la partie de ce chapitre concernant la régulation de l'expression de la GAPDH, nous avons observé une corrélation entre la variation du taux d'expression de la GAPDH et sa localisation nucléaire suite à certains stimuli. Une réduction de la translocation nucléaire de la GAPDH diminue notamment l'activité cytotoxique de l'AraC [143]. Puisque notre étude porte également sur une molécule antitumorale qui cible l'ADN, il paraît important de vérifier par quel processus la GAPDH est transloquée et quelles en sont les conséquences. Les données actuelles montrent que des modifications post-traductionnelles sont nécessaires à la translocation nucléaire de la protéine.

4.4.2.1. Modifications post-traductionnelles

***S-nitrosylation.** L'oxide nitrique (NO) cause une mort nécrotique des cellules via la formation de peroxy-nitrite. Ce puissant oxydant produit des cassures de l'ADN, une peroxydation lipidique et une oxydation des protéines [205]. Récemment, une étude a montré que le NO pouvait induire l'apoptose des cellules par un autre mécanisme encore peu connu, mais qui impliquerait une S-nitrosylation sur la Cys¹⁵² de la GAPDH [206]. *In vitro*, la GAPDH interagit par ses résidus 222-238 (dont la Lys²²⁷ est essentielle) aux résidus 270-282 de la protéine Siah [5] présentant une activité E3-ubiquitine ligase. La Siah stabilisée par la GAPDH entre dans le noyau et dégrade ainsi plusieurs protéines nucléaires [3] (figure 42). En effet, les cellules HEK293 traitées au GSNO (glutathion nitrosylé), ou les macrophages (RAW264.7) traités au LPS (lipopolysaccharide, inducteur de l'apoptose via la production de NOS) présentent une S-nitrosylation de la GAPDH, une augmentation du taux du complexe GAPDH/Siah1 mais aussi une augmentation du taux nucléaire de GAPDH-Cys-SO₃H [5].

Dans les lignées cancéreuses thyroïdiennes, la protéine TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) interagit avec les récepteurs de mort DR4 et DR5 pour finalement activer la caspase 3. Elle module également la production de NO, permettant alors la S-nitrosylation de la GAPDH ainsi que sa translocation nucléaire [207]. Dans les cellules mésencéphaliques de rat, le paraquat (herbicide non sélectif dérivé de la pyridine, qui aurait un lien avec la maladie de Parkinson) induit également une augmentation du taux de NO qui conduit à la translocation nucléaire de la GAPDH de manière dépendante à la cascade de mort cellulaire NO/GAPDH/Siah [208].

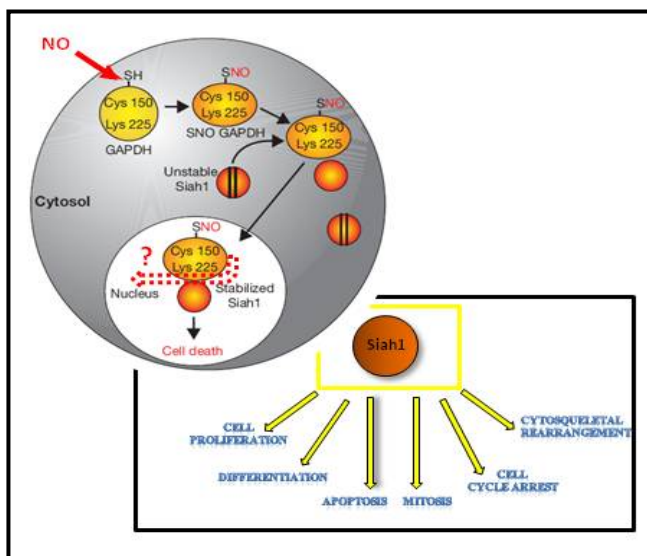


Figure 42: Cascade de mort cellulaire NO/GAPDH-S-nitrosylée/Siah1 et implication de la Siah dans d'autres voies signalétique, d'après [5]. La GAPDH nitrosylée par le NO stabilise la Siah, le complexe entre alors dans le noyau et permet ainsi à la Siah de dégrader diverses protéines comme p53 par exemple, conduisant dans ce cas à la mort de la cellule. La Siah est capable de dégrader d'autres protéines nucléaires, pouvant aboutir à un arrêt ou au contraire à une prolifération du cycle cellulaire.

***Acétylation.** La GAPDH peut également être acétylée en Lys¹¹⁷, ²²⁷ et ²⁵¹ par l'acétyltransférase PCAF (P300/CBP-associated factor). L'acétylation en Lys²²⁷ est requise

pour la translocation nucléaire de la GAPDH [209]. Comme Siah1, PCAF possède une activité ubiquitine ligase, qui pourrait participer au processus apoptotique [210].

***O-GlcNacylation.** La GAPDH peut être modifiée (O-GlcNacylation) par une N-Acétyleglycosamine au niveau de l'oxygène de la Thr²²⁹. Cette modification déstabilise les interfaces hydrophobes entre chacune des sous-unités de la GAPDH tétramérique et lui permet d'être transloquée sous forme de monomère du cytoplasme vers le noyau [211]. Cette modification est retrouvée au niveau de la plupart des protéines qui sont transloquées du cytoplasme vers le noyau comme par exemple NF-κB [212].

4.4.2.2. Translocation et conséquences cellulaires

(tableau 3)

La translocation nucléaire peut avoir lieu de manière spontanée et induire la mort cellulaire dans le cas de la maladie de Parkinson ou d'Huntington par exemple. L'entrée en apoptose des cellules découle souvent d'un stress oxydatif, avec l'apparition d'H₂O₂ ou de NO qui induisent alors des modifications post-traductionnelles de la GAPDH. De manière globale, et par rapport aux données actuelles de la littérature, la translocation nucléaire de la GAPDH, qui fait suite ou non à des stimuli extérieurs, est corrélée à une entrée en apoptose des cellules [144, 145, 213-221]. Cependant, le mécanisme exact qui fait suite à la translocation et qui engendre la mort des cellules n'est pas encore bien connu. Il faut noter aussi que malgré la présence d'une quantité importante de GAPDH nucléaire sans stimuli (cellules SH-SY5Y) [222] ou suite à une translocation nucléaire de la GAPDH pendant la phase S du cycle (A549) [223], les cellules n'entre pas en apoptose.

De plus, dans certains cas, un défaut de la translocation nucléaire de la GAPDH n'empêche pas forcément l'entrée en apoptose des cellules [222]. Enfin sous certaines conditions, la translocation est réversible, elle conduit alors à un arrêt du cycle plutôt qu'à une induction d'apoptose. Et, contrairement à l'import, l'export de la GAPDH n'apparaît pas comme étant dépendant du cycle cellulaire puisque l'olomoucine (induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1) et l'inhibiteur PD098059 de la voie de prolifération MAPK n'empêchent pas le retour de la GFP-GAPDH dans le cytoplasme après ajout de sérum.

Type cellulaire	Stimuli	Conséquences de la translocation nucléaire de la GAPDH	Conséquences observées
cellules neuronales de la substance noire	Aucun	apoptose (maladie de Parkinson) [224]	- Translocation nucléaire précède la diminution du Ψ_{mt} [145, 225, 226] -Augmentation du taux de caspase 3 et de Bax [224]
cellules de la maladie d'Huntington	Aucun	-poptose (maladie d'Huntington) [227]	Formation d'un complexe ternaire GAPDH/Siah1/mHtt. Une surexpression de la GAPDH ou de Siah1 augmente la translocation de mHtt (huntingtine mutée) ainsi que la cytotoxicité, alors qu'une déplétion aura l'effet contraire [227]
les cellules de neuroblastome humaine	rotenone (toxine produisant des neuropathologies ressemblant à la maladie de Parkinson)	apoptose (maladie de Parkinson) [215]	Le déprényl (neuroprotecteur, anti-Parkinson) protège les cellules de l'apoptose en empêchant la S-nitrosylation de la GAPDH, son interaction à Siah et sa translocation nucléaire [228]
cellules cérébelleuses immatures	AraC	apoptose[229]	nd
	milieu pauvre en K+	apoptose[229]	Translocation mitochondriale de la GAPDH [229]
SH-SY5Y (cellules dopaminergiques humaines)	N-methyl(R)salsolinol (une neurotoxine dopaminergique)	apoptose[213]	Surexpression de Bcl2 ou traitement avec la rasagiline (un inhibiteur de Monoamine Oxydase, anti-Parkinson), limite la translocation nucléaire de GAPDH et prévient ainsi l'apoptose [213]
cellules primaires de neurones	NDMA (N-Methyl-D-Aspartate)	apoptose[230]	GOSPEL (GAPDH's competitor of Siah Protein Enhances Life) empêche la mort induite par NDMA, sa S-nitrosylation en Cys ⁴⁷ lui permet d'interagir avec la GAPDH [230]
SH-SY5Y (GAPDH est exclusivement dans le noyau en condition normal) et NB41A3 (GAPDH est distribuée de manière égale entre noyau et cytoplasme)	MMP+ (=1-Methyl-4-phenyl-pyridium iodide, un inhibiteur du complexe I du système de transfert d'électron de la mitochondrie)	apoptose non liée à la translocation nucléaire de la GAPDH [222]	Transfection de manière stable d'un gène de GAPDH comprenant ou non une partie NLS (Nuclear Localization Signal) ajoutée en C-Ter [222]
A549, HeLa	aucun, phase S du cycle cellulaire	pas d'apoptose, maintenance cellulaire [223]	-Réparation [231, 232], réplication ou co-activation de transcription [233]. -Translocation est indépendante de la translocation induite par Siah1 durant l'apoptose [5].
R6-Bcl2(fibroblastes surexprimant Bcl2)	surexpression de GAPDH-GFP [213]	pas d'apoptose [213]	-
A549	doxorubicine ou gemcitabine	pas d'apoptose dépendante des caspases [234]	Arrêt du cycle cellulaire [234] car pas d'interaction aux télomères (en lien avec la partie « Fonctions nucléaire »)
cellules fibroblastiques embryonnaires de souris NIH3T3	déplétion en sérum	pas d'apoptose, réversibilité de la translocation par ajout de sérum ou de facteur de croissance (EGF ou PDGF) dans le milieu de culture [235].	Présence d'un NES (Nuclear Export Signal) (résidus 259 à 271) moins riche en leucine que ceux rencontrés habituellement, fixation de CRM-1 à NES de la GAPDH puis export au travers des pores nucléaires [236]

Tableau 3: Translocation nucléaire de la GAPDH dans différentes lignées et conséquences associées.

Il existerait donc plusieurs mécanismes de translocation, responsables du maintien d'un bon fonctionnement cellulaire ou d'une induction en apoptose des cellules. La S-nitrosylation et l'acétylation permettent à la GAPDH d'être impliquée dans différentes voies apoptotiques connues. Ces expériences ont également mis en évidence une voie de mort par apoptose dépendante de NO, dont la GAPDH fait partie (*figure 42*) et qui se mettrait en place parallèlement aux voies d'induction de l'apoptose déjà connus. En effet, la surexpression ou la translocation d'une GAPDH exogène n'induit pas forcément l'apoptose. L'étude de l'activité et de la structure de l'isoforme nucléaire de la GAPDH endogène, transloquée lors de l'apoptose des cellules, permettrait de mieux comprendre d'une part pourquoi, et suite à quel mécanisme moléculaire, la GAPDH est transloquée dans le noyau lors d'un stress et d'autre part comment la GAPDH transloquée contourne l'inhibition de croissance par les agents de chimiothérapie.

4.5. Fonctions nucléaires

Afin de mieux comprendre les conséquences de l'interaction de la GAPDH au niveau de l'adduit S23906-1/ADN, nous avons recherché quelles étaient les fonctions nucléaires de la GAPDH. Plusieurs études ont révélés des interactions directes ou indirectes de la GAPDH à l'ADN.

4.5.1. Maintien structural de la chromatine

La GAPDH est retrouvée au niveau de l'ADN télomérique de cellules A549 suite au traitement par la doxorubicine et par la gemcitabine [223]. *In vitro*, la GAPDH se fixe de manière di- ou tétramérique préférentiellement sur les séquences de type télomérique simple brin via ses résidus Asp³⁴ ou Cys¹⁵² [234]. En effet, la mutation pour chacun de ces sites inhibera la fixation de la GAPDH à l'ADN mais n'empêchera pas la translocation nucléaire. On observe alors un raccourcissement des séquences télomériques suivi d'un arrêt du cycle cellulaire mais pas d'apoptose dépendante des caspases [234]. La surexpression de la GAPDH empêche cette dégradation télomérique après exposition des cellules aux céramides [223]. Il faut noter que l'association de la GAPDH aux télomères n'est pas spécifique des cellules cancéreuses [234]. Enfin, comme observé précédemment avec l'ARN, la liaison à l'ADN se ferait via le site de fixation au NAD⁺.

L'interaction de la GAPDH à cette séquence jouerait ici plutôt un rôle dans la résistance aux agents de chimiothérapie. Ce rôle anti-apoptotique a déjà été montré avec l'implication de la GAPDH dans la survie des cellules après diminution de Ψ_{mt} [192].

4.5.2. Réplication

➤ **Relaxation par la topoisomérase I.** Suite à un traitement avec H_2O_2 des cellules HEK293T, la GAPDH est oxydée et interagit alors avec le complexe p54nrb/PSF. p54nrb est impliquée dans de multiples fonctions nucléaires, son interaction au PSF (Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor) augmente l'activité de relaxation de la topoisomérase I. Paradoxalement, l'interaction a lieu dans le cytoplasme, bien que p54nrb soit localisé majoritairement dans le noyau. On observe cependant que suite au traitement de ces cellules avec 2,5mM de H_2O_2 , la GAPDH quitte le noyau pour y revenir progressivement [237].

➤ **Inhibition de l'ADN polymérase α .** La GAPDH de thymus de veau interagit préférentiellement avec de l'ADNsb et présente une capacité de fixation à l'ADN plus forte que celle de l'ADN polymérase α , inhibant ainsi la synthèse d'ADN [238].

4.5.3. Régulation de la transcription

Différents gènes sont régulés par l'intermédiaire de la GAPDH, notamment par interaction avec les facteurs de transcription.

➤ **Activation de la transcription des gènes H2B pendant la phase S.** Les histones jouent un rôle essentiel dans le maintien structural des chromosomes, leur réplication et leur transcription. Leurs gènes sont présents en plusieurs copies et leur expression, très contrôlée, a lieu principalement en phase S du cycle cellulaire, de manière dépendante de la réplication de l'ADN. Le taux d'expression et la capacité de fixation à l'ADN de l'octamère Oct-1, qui régule la transcription de H2B, ne varie pas durant toutes les phases du cycle cellulaire [239]. La transcription au cours du cycle est donc contrôlée par des cofacteurs spécifiques de la phase S. En effet, une étude sur des extraits nucléaires de cellules HeLa a montré la présence de 7 autres protéines : nm23-H1, nm23-H2, UDG (Uracyle-DNA Glycosylase), LDH, HSP70, Sti1 et la GAPDH au sein du complexe OCA-S (Oct-1 coactivator in S phase). La transcription de H2B nécessite un statut redox $NAD^+/NADH$ approprié, apporté par la LDH, qui stabilise alors l'interaction directe entre la GAPDH et Oct-1 [233, 240]. De plus, la GAPDH présenterait un domaine intrinsèque qui serait activé par un co-facteur, encore non

identifié, de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase II [240]. Il a été montré que la GAPDH interagissait aussi avec l'ARN polymérase II d'eucaryote [241].

➤ Activation de la transcription par l'oncogène hTAF_{II}68-TEC. Des études de chromatographie d'affinité *in vitro* ont mis en évidence l'interaction de la GAPDH avec le facteur de transcription oncogénique hTAF_{II}68-TEC. Des tests de GST pull-down (Gluthatione S-Transferase pull-down) ont révélé que la GAPDH se liait plus particulièrement via les acides aminés 1-66, 67-160 et 160-248 avec la région C-terminale de hTAF_{II}68-TEC. La GAPDH non mutée augmente l'activité transcriptionnelle de hTAF_{II}68-TEC. De plus, des expériences de transfection des cellules avec un plasmide Flag- hTAF_{II}68-TEC, ont montré que la relocalisation de la GAPDH dans le noyau était corrélée à la formation du complexe GAPDH/ hTAF_{II}68-TEC [244].

➤ Activation de la transcription du gène Atg12 et protection contre l'apoptose. La GAPDH nucléaire augmente l'expression d'Atg12 qui va à son tour activer le processus d'autophagie pour dégrader les mitochondries « défectueuses », et ainsi inhiber la voie apoptotique dépendante de la mitochondrie CICD. Cependant, aucune interaction directe entre la GAPDH et l'ADN n'a été observée. De plus, le complexe protéique impliqué n'est pas connu [192].

➤ Stimulation de l'ARN polymérase II. Le pool de GAPDH isolé de cellules de muscle squelettique de lapin présenterait 2 types de GAPDH : un type qui se fixe uniquement sur l'ADNsb et l'autre qui se fixe à de l'ADNdb. Il faut noter que la GAPDH qui interagit avec l'ADNsb ne stimule pas l'ARN polymérase II, alors que celle qui interagit avec l'ADNdb la stimule [245].

➤ Activation indirecte de p53 et induction de l'apoptose. En interagissant avec CBP (p300/CREB Binding Protein), la GAPDH est acétylée sur la Lys¹⁶² de manière NO-dépendante. En retour, la GAPDH stimule l'auto-acétylation de la CBP [246], qui va alors activer p53 et induire la mort cellulaire [247].

La GAPDH régule donc la transcription de gènes impliqués dans des voies anti-apoptotiques ou de prolifération cellulaire en interagissant avec les complexes protéiques de régulation et/ou directement avec l'ADN.

4.5.4. Réparation des lésions de l'ADN

➤ Implication dans la voie BER (Base Excision Repair). Cette voie est notamment impliquée dans la réparation de bases endommagées par des agents alkylants [89]. La voie



BER peut conduire à deux mécanismes de réparation : la « short-patch »- et la « long-patch »- BER. Celles-ci débutent toutes deux par le recrutement d'une UDG (liaison à l'ADNsb ou db) qui génère un site abasique. La protéine APyrimidic/APuric Endonuclease 1 (APE1) clivera ensuite le pont phosphodiester en 5', puis la polyADP-ribose polymérase (PARP) ajoutera des groupements ADP-ribose pour marquer l'ADN lésé et le rendre accessible aux protéines de réparation telles que XRCC1, mais également pour empêcher la fixation de l'ADN polymérase α [7].

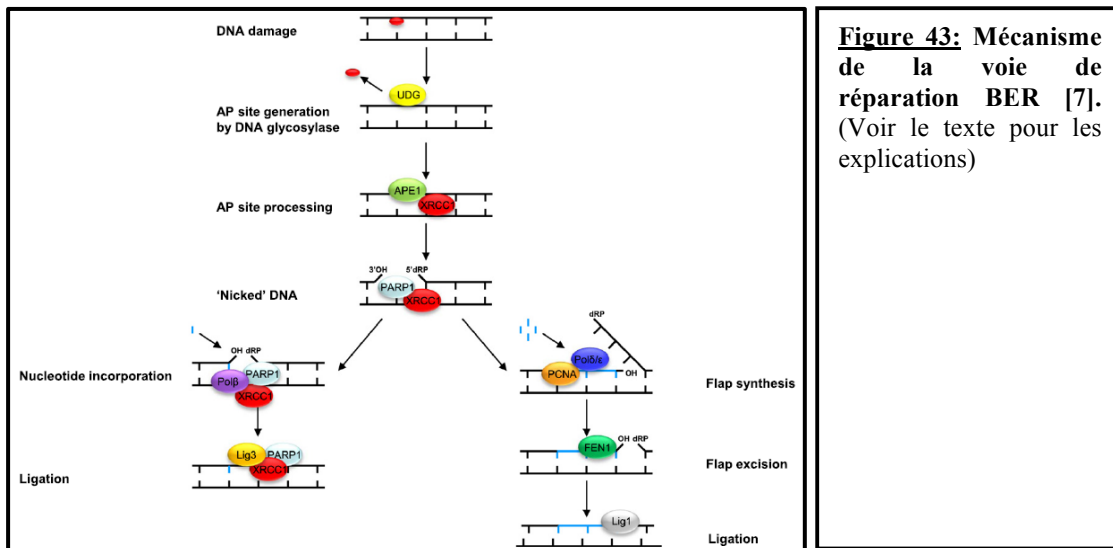


Figure 43: Mécanisme de la voie de réparation BER [7]. (Voir le texte pour les explications)

Le monomère de GAPDH présente une activité UDG [231, 248], mais qui est deux fois moins active que l'UDG d'*E. coli*. [127]. De plus, il y aurait deux types d'UDG : l'UDG1 est plutôt localisée au niveau des mitochondries alors que les différentes isoformes phosphorylées d'UDG2 sont plutôt localisées dans le noyau [249]. Des expériences de GST-pull down et de co-immunoprécipitation montrent que la GAPDH interagit avec APE1. En présence d' H_2O_2 , la GAPDH réduit la forme oxydée d'APE1 par l'intermédiaire de son résidu Cys¹⁵² et réactive ainsi l'activité endonucléasique [232]. De plus lors d'un stress, l'ADN endommagé provoque l'augmentation du niveau de diadénine polyphosphate (Ap4A) qui vont être reconnues par une PARP [250], mais aussi par l'UDG/GAPDH dans les cellules HeLa [251]. Enfin, le taux d'expression ainsi que l'activité de la GAPDH/UDG augmente durant la prolifération de fibroblastes normaux de poumon embryonnaire WI-38 [133].

➤ **Implication dans la voie MMR (MisMatch Repair) indépendante de MutSa.** La voie de réparation MMR reconnaît un mésappariement (occasionné par les erreurs de réplication) ou une guanine anormale (thioguanosine) [122]. Le traitement à la mercaptopurine de lignées de leucémies lymphoblastiques, déficientes ou surexprimant certaines des protéines impliquées dans la voie de réparation MMR, a montré que la sensibilité des cellules au traitement n'était

pas dépendante de l'expression de ces protéines. L'équipe de Krynetski a mis en évidence une voie de réparation MMR indépendante de MutS α et impliquant un complexe de 5 protéines HMG-B1, HMG-B2, HSC-70, ERp60 et la GAPDH [252]. La HMG-B1 interagit directement avec l'ADN contenant des dG^s (thioguanosine) et la GAPDH ne se retrouverait qu'en périphérie du complexe car elle s'y en détache facilement. Les mêmes résultats ont été obtenus avec un traitement au 5-FU pour lequel une augmentation de l'expression de la GAPDH a été observée [253].

Ainsi, la GAPDH est impliquée dans la reconnaissance de certaines lésions de l'ADN.

4.5.5. Interaction Acides Nucléiques et reconnaissance d'adduits

Certaines modifications post-traductionnelles permettent à la GAPDH d'interagir avec les acides nucléiques, l'oxydation des groupements thiols des sites actifs lui permettrait notamment de changer de structure (apparition de forme mono- et dimériques) [254]. La glutathionylation et la nitrosylation de la GAPDH, impliquées aussi dans la translocation nucléaire, sont également des médiateurs potentiels dans l'interaction de la GAPDH à l'ADN. Des expériences de retard en gel ont montré que chacune de ces isoformes interagissait avec un fragment d'ADN de 248pb [255].

Un des mécanismes par lequel les bis-électrophiles exercent leur cytotoxicité est l'induction de crosslinks ADN/peptide génotoxiques. La GAPDH a été identifiée comme étant une protéine nucléaire très nucléophile de part ses résidus Cys¹⁵² et Cys²⁴⁶ [256]. Des tests *in vitro* ont notamment montré que la fixation de diepoxybutane (agent alkylant l'ADN) à la Cys²⁴⁶ de la GAPDH favoriserait son interaction à l'ADN. Cependant, la surexpression de GAPDH humaine dans *E. coli*. n'augmente pas la mutagénicité du composé diepoxybutane, contrairement à ce qui est observé avec la surexpression de la protéine de réparation O6-alkylguanine DNA-alkyltransférase [257].

De manière tout à fait intéressante, une étude a permis d'identifier la GAPDH comme partenaire des adduits ADN/QAD (un dérivé de la Saframycine A) et ADN/Pt650 (un dérivé de l'ET-743) [221]. L'ET-743 et la Saframycine A (composé naturel d'origine bactérienne) présentent des homologies structurales et alkylent tous deux le groupement N2 des guanines. Des expériences complémentaires ont montré que la GAPDH, potentiellement sous forme de monomère, interagirait avec l'adduit. Après traitement de levures à la Saframycine A ou aux QAD, une augmentation de l'expression de trois isoformes de la GAPDH (gènes *TDHI*, 2 et 3) est observée [258]. De plus, après 48H de traitement des cellules HeLa-S3 avec QAD, on

observe une translocation nucléaire de la GAPDH. Enfin, les cellules A549 traitées avec un siRNA dirigé contre la GAPDH sont plus résistantes à QAD, la GAPDH serait donc impliquée dans l'activité cytotoxique de QAD [221].

4.6. Bilan des fonctions de la GAPDH

4.6.1. Diabète, inflammation, infection

Le diabète cause des changements pathologiques au niveau des capillaires (hypoxie des cellules et activation des ROS, des NO), des artères et des nerfs périphériques [259]. Une hyperglycémie induite dans les cellules endothéliales de l'aorte engendre l'activation de ROS, qui induit une forte production de superoxide par les mitochondries générant des DSBs. Ceci favorise le recrutement et l'activation de la PARP qui pourra alors poly(ADP-ribosyler) la GAPDH nucléaire. En retour, cette modification post-traductionnelle de la GAPDH activera le facteur de transcription proinflammatoire NF- κ B, [178, 179]. De plus, certains patients atteints de diabète et présentant des complications rénales ont un taux plus élevé de méthylglyoxal (MG) par rapport aux patients résistants. Le MG est formé durant la glycolyse, notamment suite à la dé-phosphorylation de la glyceraldéhyde-3-phosphate [260]. Le MG induit la glycation de nombreuses protéines, responsable majeure des complications du diabète. L'interaction du MG à la GAPDH inhibe l'activité de cette enzyme, et conduit alors à une boucle d'augmentation de la formation de MG *in vitro* et *in vivo* [261]. Enfin, nous avons vu précédemment que la GAPDH présentait une activité anti-inflammatoire (complexe GAIT) mais aussi un rôle pathogène ou anti-inflammatoire (interaction avec les ARNm).

4.6.2. Survie, prolifération cellulaire et maintenance

Dans les cellules A549, le taux de GAPDH nucléaire est à son maximum en phase S [223]. Il a été montré que la GAPDH interagissait avec SET pour libérer la cycline B-Cdk1 qui peut alors exercer ses fonctions au sein du cycle cellulaire. De plus, la GAPDH peut également interagir avec la cycline B sans modifier l'activité du complexe cycline B-Cdk1 [262]. Cependant, SET est impliqué dans la réorganisation de la chromatine, la transcription, l'acétylation des histones et l'apoptose. Son interaction à la GAPDH peut engendrer des dérégulations de ces différentes fonctions cellulaires [262]. La GAPDH présente également d'autres fonctions de survie/maintenance de la cellule que nous avons vu précédemment (assemblage des microtubules, transcription des gènes H2B, réparation des lésions), mais aussi un rôle d'oncogène de part son activité transcriptionnelle (oncogène hTAF_{II}68-TEC) ou

anti-apoptotique (inhibition de CICD). Enfin elle est impliquée dans la transmission d'informations intra- ou extracellulaires (échanges membranaires, transport vésiculaire, activité kinasique).

4.6.3. Activité antiproliférative et maladies neurodégénératives

La GAPDH joue un rôle important dans les maladies neurodégénératives, son implication en tant que neurotoxique est généralement liée à sa sensibilité au NO. La GAPDH interagit avec la protéine Huntingtin mutée impliquée dans les symptômes de la maladie d'Huntington, ainsi qu'avec d'autres protéines, présentant également des répétitions en glutamine et impliquées dans d'autres maladies neurodégénératives comme l'ataxie spinocérébelleuse de type I (interaction ataxin1) ou l'atrophie pallidolusyan dentorubral (interaction avec l'atrophine) [263-265]. Plusieurs études ont montré la localisation de la GAPDH au niveau des plaques amyloïdes [266, 267]. La GAPDH oxydée interagit avec le domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (protéine transmembranaire qui peut être clivée et donner naissance au peptide A β) [268, 269] et le peptide A β lui-même [270][271], suggérant que la GAPDH joue un rôle dans la progression de la maladie d'Alzheimer. Suite au stress oxydatif, les beta-amyloïdes induisent l'apparition de ponts disulfures entre plusieurs GAPDH (β -structures) dans les tissus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [263]. Les β -structures se forment d'abord dans le noyau des cellules corticales de neurones, puis deviennent insolubles et induisent directement ou indirectement l'apoptose ; les agrégats libérés dans le milieu extracellulaire forment des plaques [263]. De plus, il a été montré que les agrégats de GAPDH pouvaient interagir avec la protéine tau phosphorylée [263, 272]. La GAPDH colocalise également avec l' α -synuclein des corps de Lewy dans la maladie de Parkinson [273]. Nous avons vu précédemment que la GAPDH était aussi impliquée dans la maladie de Parkinson, et pouvait exercer des fonctions pro-apoptotique (localisation mitochondriale, activation indirecte de p53, interaction aux adduits ADN/QAD).

Au fil des années, les multiples fonctions non glycolytiques de la GAPDH sont progressivement identifiées. Chacune de ces activités est régulée en fonction de la localisation intra- ou extracellulaire de la GAPDH, et de sa structure oligomérique en lien avec les différentes modifications post-traductionnelles mises en évidence. On observe par ailleurs une grande variation du taux de la GAPDH et de localisation subcellulaire suite à différents stimuli (environnement extracellulaire, métabolisme intracellulaire et cycle cellulaire).

Cependant, l'activité de la GAPDH la plus étudiée est sa fonction de catalyseur de la voie apoptotique. Suite aux différentes modifications qu'elle subit et aux diverses interactions moléculaires qu'elle entretient, la GAPDH est impliquée dans la mort cellulaire spontanée ou induite par des agents chimiques de cellules neuronales ou non neuronales. Dans la plupart des cas, le stress oxydant conduit à la modification directe ou indirecte de la GAPDH, qui est alors transloquée dans le noyau, notamment via son interaction avec Siah1, et peut ainsi réguler la transcription ou l'activation des molécules pro-apoptiques ou alors participer au maintien du bon fonctionnement de la cellule.

CHAPITRE II :
Objectifs des travaux
de thèse

Le S23906-1 est donc un nouvel agent alkylant de l'ADN au mode d'action original de par sa fixation dans le petit sillon de l'ADN et sa capacité d'ouverture locale de la double hélice d'ADN. Son étude représente le **premier grand axe de recherche** de cette thèse avec plusieurs objectifs.

En effet, si un faisceau d'arguments convergent vers une alkylation de la guanine par le S23906-1, celle-ci n'a pour l'heure pas été formellement établie. Le *premier objectif* de ce travail est donc de **valider la formation de l'adduit guanine/S23906-1** par le biais d'une approche de spectrométrie de masse.

Un *deuxième objectif* est de déterminer si certains **éléments structuraux** du S23906-1 sont **importants pour le processus de déstabilisation de l'hélice d'ADN** en utilisant différents dérivés ou différents isomères du S23906-1.

Ensuite, les conséquences en termes de reconnaissance par les protéines de la machinerie cellulaire (réparation, transcription, réplication, structuration de la chromatine) au niveau de cet adduit particulier seraient vraisemblablement différentes de celles s'opérant en présence de molécules fixées dans le grand sillon de l'ADN et/ou stabilisant la double hélice d'ADN. C'est pourquoi, le *troisième objectif* majeur de ce travail consiste à **identifier les partenaires protéiques des adduits S23906-1/ADN** afin de débiter la cascade des événements signalétiques qui aboutissent à la mort de la cellule tumorale traitée par cette molécule. De manière inattendue, la GAPDH a été identifiée. Cette protéine est présente dans la cellule sous différentes isoformes jouant des rôles très différents impliqués à la fois dans des activités cellulaires normales ou pathologiques (cancer, neurodégénérescence, diabète, infection). Nous évaluerons donc **l'implication de la GAPDH dans l'activité cytotoxique** du S23906-1.

Parmi ces fonctions biologiques, la GAPDH est capable de se lier à l'ADN et à certains adduits mais sa spécificité d'interaction à l'ADN n'est pas clairement établie. Le *quatrième objectif* est de **déterminer la sélectivité d'interaction à l'ADN de la GAPDH** et si celle-ci change après formation de l'adduit du S23906-1.

Mes travaux de thèse ont également porté sur l'étude du JLK1486, un dérivé hydroxyquinoline présentant des propriétés d'alkylation. Des résultats préliminaires ont montré une certaine activité antitumorale sur différentes lignées cellulaires, en particulier sur les lignées de glioblastome chimiorésistantes. Le **second grand axe de ma thèse** consiste à **identifier les cibles nucléotidiques ou protéiques du JLK1486** afin de comprendre son mécanisme d'action.

Enfin ces trois années de thèse ont été enrichies par **l'étude d'autres composés** présentant une activité cytotoxique (dérivés de la nitidine et de l'ellipticine) qui sont le fruit de deux collaborations différentes et d'un travail d'équipe et que je développerai en dernier lieu dans un troisième grand axe.

CHAPITRE III :
Résultats et discussions

Partie I : Projet S23906-1

1. Interaction à l'ADN et déstabilisation

1.1. Validation de l'interaction du S23906-1 aux guanines

Les données publiées actuellement ont clairement montré que le composé S23906-1 alkyle des oligonucléotides riches en paires de bases GC et non pas AT ou IC [14]. En effet, l'utilisation d'EI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry) sur des oligonucléotides en épingle à cheveux contenant 3 guanines (5'-CTATG₁ACTCTG₂TCATAG₃) et incubés avec le S23906-1 présentaient de 1 à 3 adduits. De même, par empreinte à la DNaseI la fixation du S23906-1 semblait impliquer les guanines [14]. De plus, l'alkylation de l'ADN par l'ET-743, un alkylant du petit sillon utilisé comme contrôle, ne permet plus au S23906-1 de se lier à l'ADN montrant clairement l'utilisation d'un site commun (groupement N2 des guanines) [274]. Afin d'identifier de manière catégorique l'alkylation des guanines par le S23906-1, des expériences de coupures enzymatiques analysées en MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-flight) ont été entreprises sur cet oligonucléotide en épingle à cheveu de 17pb. Les résultats sont présentés en *figure 44* et les pics attendus et obtenus pour l'ADN libre et alkylé dans le *tableau 4*.

Pic	Séquence	Oligonucléotide non alkylé		Oligonucléotide mono alkylé	
		Masse attendue	Masse observée	Masse attendue	Masse observée
G17	5'-CTATGACTCTGTGCATAG	5160,4	5159	5589,4	5587
A16	5'-CTATGACTCTGTGCATA	4831,2	4830	5260,2	5257
T15	5'-CTATGACTCTGTGCAT	4518,0	4516	4947,0	4944
A14	5'-CTATGACTCTGTCA	4213,8	4212	4642,8	4642
C13	5'-CTATGACTCTGT	3900,6	3898	4329,6	4328
T12	5'-CTATGACTCTG	3611,4	3609	4040,4	4039
G11	5'-CTATGACTCT	3307,2	3305	3736,2	3733
T10	5'-CTATGACTCT	2978,0	2975	3407,0	-
C9	5'-CTATGACT	2673,8	2671	3102,8	3103
T8	5'-CTATGACT	2384,6	2381	2813,6	2814
C7	5'-CTATGAC	2080,4	2077	2509,4	2510
A6	5'-CTATGA	1791,2	1787	2220,2	2221
G5	5'-CTATG	1478,0	1474	1907,0	1907
T4	5'-CTAT	1148,8	1144	1577,8	-
A3	5'-CTA	844,6	840	1273,6	-
T2	5'-CT	531,4	-	960,4	-
C1	5'-C	227,2	-	656,2	-

Tableau 4: Identification de l'interaction du S23906-1 aux guanines par MALDI-TOF. Les masses des pics obtenus sur chacun des spectres MALDI-TOF sont comparées aux masses des pics attendus. Les pics annotés de la figure 44 correspondent aux fragments d'ADN alkylés (rouge) ou non (bleu) par le S23906-1 puis digérés par la phosphodiesterase I. Les fragments T4 et A3 alkylés ne sont pas retrouvés.

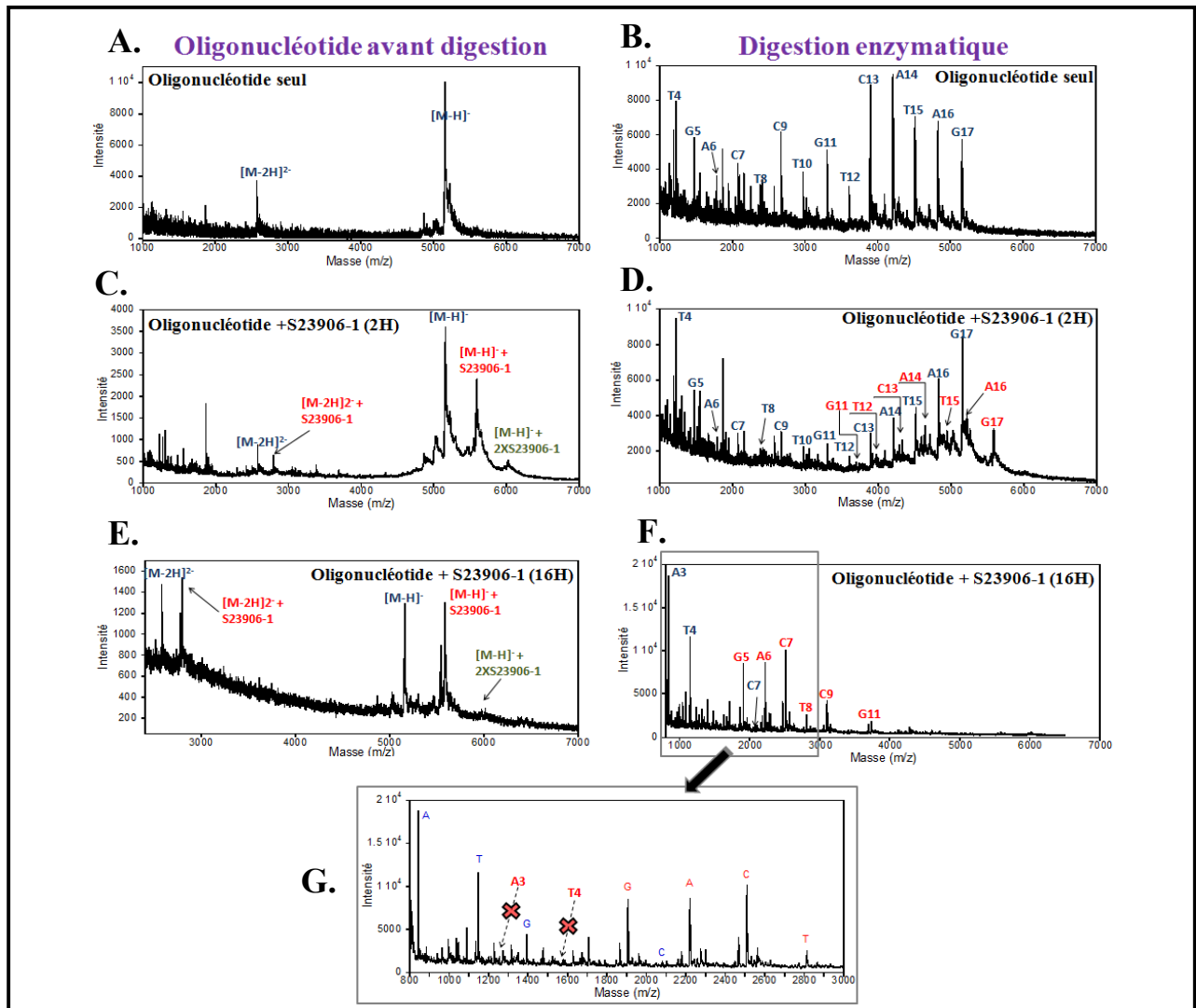
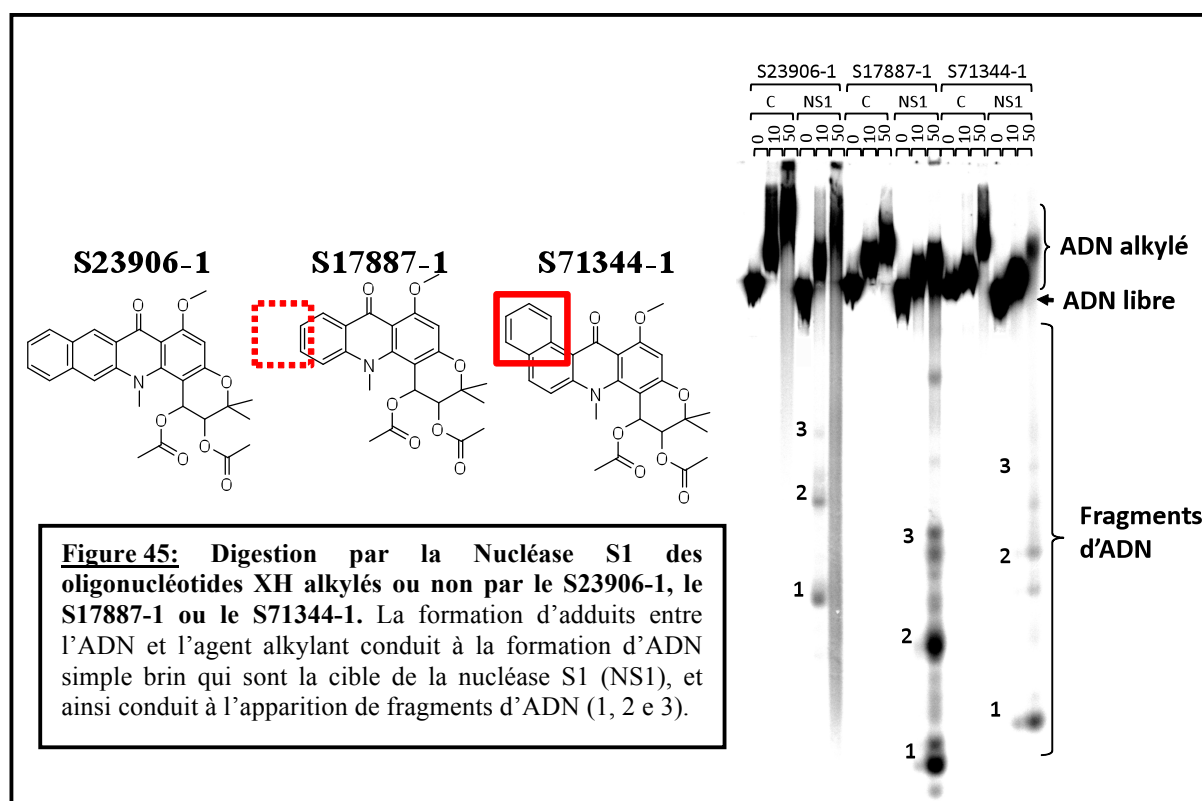


Figure 44: Analyse MALDI-TOF de l'interaction du S23906-1 aux guanines. (A,C,E) L'oligonucléotide (50 μ M) est seul (A) ou incubé avec 200 μ M de S23906-1 pendant 2H (C) ou 16H (E). (B,D,F,G) L'oligonucléotide est digéré progressivement de 3' en 5' par la phosphodiesterase I de venin de serpent. Les pics obtenus par MALDI-TOF représentent les fragments oligonucléotidiques non alkylés (bleu) ou alkylés par une (rouge) ou deux molécules (vert) de S23906-1. Les fragments oligonucléotidiques alkylés A3 et T4 ne sont pas retrouvés dans le spectre (G).

Après 2H ou 16H d'incubation, 1 à 2 molécules de S23906-1 se lient à l'oligonucléotide (figure 44-C et 44-E). Cet ADN est ensuite digéré par la phosphodiesterase I de 3' en 5' (tableau 4). Suite à la coupure enzymatique, nous observons que les séquences G17, G11 et G5, qui comportent respectivement 3, 2 et 1 guanines, interagissent avec une seule molécule de S23906-1 (figure 44-C et 44-E). Les digestions supplémentaires effectuées sur le fragment oligonucléotidique G5 nous montrent uniquement des fragments non alkylés. En effet, aucun pic correspondant à la séquence 5'-CTAT alkylée (fragment T4 figure 44-G) ou 5'-CTA alkylée (fragment A3 figure 44-G) n'est retrouvé. Ces séquences ne contenant pas de guanine, les résultats de cette expérience sont un nouvel argument en faveur de l'interaction unique du S23906-1 à la guanine.

1.2. Déstabilisation de l'ADN

Le S23906-1 interagit avec l'azote en position 2 des guanines [14], ce qui mobilise un atome donneur de liaison hydrogène et réduit ainsi le nombre de ponts possibles entre la guanine et la cytosine. Des expériences de mesure de fluorescence [2], de retard en gel [2] et de coupure à la nucléase S1 (*figure 45*) ont mis en évidence l'apparition d'ADNsb suite à l'incubation du S23906-1 avec un ADN de 117pb. Nous avons évalué certains dérivés du S23906-1 présentant ou non le cycle benzène additionnel à différentes positions (S17887-1 et S71344-1) (*figure 45*).



Par digestion à la nucléase S1, ce gel (*figure 45*) montre des fragments générés plus ou moins longs, signal d'une capacité d'induction d'ADNsb différente entre chacun des composés. En effet, un nombre plus important de fragments d'ADN court est obtenus pour le composé S17887-1 (dérivé diacétate de l'acronycine sans cycle additionnel), ce qui implique une déstabilisation plus forte de l'ADN par rapport aux composés S23906-1 et S71344-1 (benzo-diacétates).

La présence d'ADNsb suggère que cet oligonucléotide de 117pb soit localement déstabilisé. Des variations importantes de la température de fusion de l'ADN (ΔT_m) ont en effet été observées entre l'oligonucléotide XH (24pb dont 14 pb GC) incubé avec le S23906-1

(ou certains dérivés) et l'oligonucléotide XH non alkylé (*figure 33*) [6]. Il est alors fort probable que les deux liaisons hydrogènes restantes entre la guanine et la cytosine soient également déstabilisées, ainsi que celles des bases environnantes (*figure 46*).

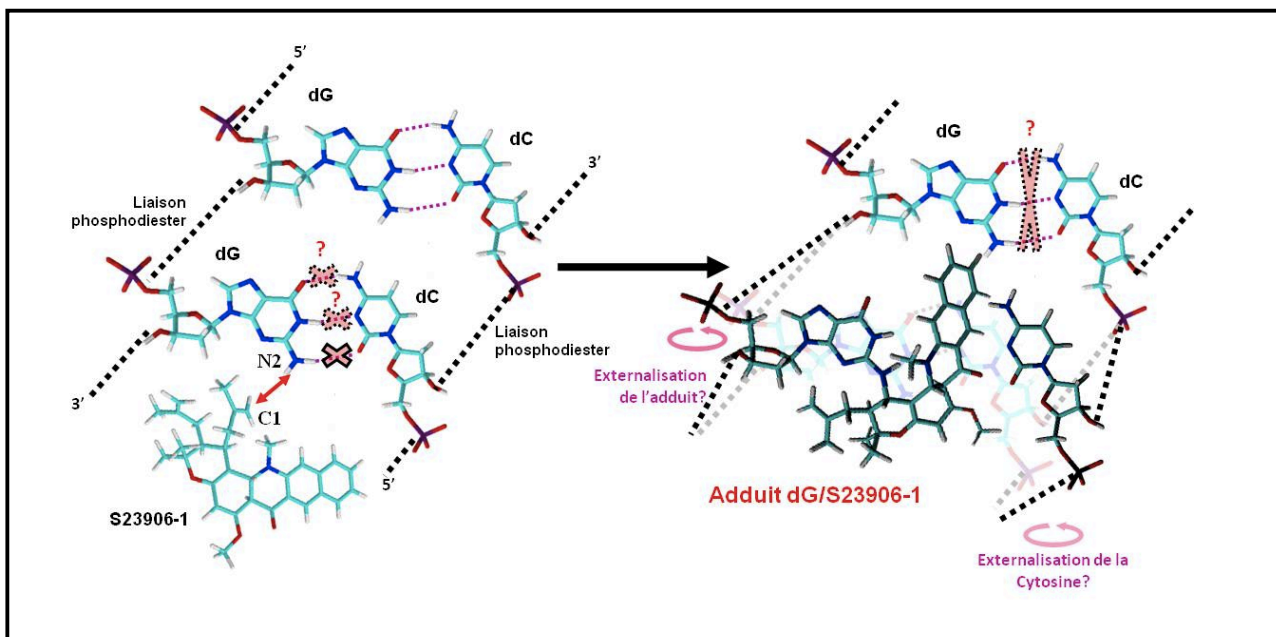


Figure 46: Schématisation de la déstabilisation du couple GC par le S23906-1. Le S23906-1 interagit avec l'azote en position 2 des guanines, réduisant ainsi le nombre de ponts hydrogènes entre la guanine et la cytosine. La fixation du composé engendre probablement un encombrement stérique au sein de la double hélice. L'adduit [guanine/S23906-1] et/ou la cytosine seront peut-être externalisés et/ou les paires de bases avoisinantes déstabilisées. (dG=désoxyguanine ; dC=désoxycytosine)

Cependant, le degré de déstabilisation au niveau des guanines ainsi que l'importance de l'ouverture locale de l'ADN en termes de nombre de paires de bases déstabilisées ne sont pas connus. Nous avons mesuré la température de fusion (T_m) de différents oligonucléotides de séquences XH contenant, sur un des deux brins, des mésappariements (cytosine→adénine), des sites délétés ou des spacers (mime d'un site abasique) (*tableau 5*). Cette expérience a pour but de mimer le mésappariement provoqué par la fixation du S23906-1, du S71344-1 ou du S29385-1 sur ce même oligonucléotide [6], à titre de comparaison.

Nom	Séquence		ΔT_m (°C)
Oligonucléotide XH (1,25μM) + alkylant (50μM) (15H)			
XHa	5' -CTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA	S23906-1	-7,5
XHb	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT	S71344-1	-7,5
		S29385-1	-16
		S17887-1	-20
XH double brin	5' -CTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA	ET-743	+20
	TCTCAGCTGGACGTCCTGTAAGTTCGA-5'	DOXO	+10
Oligonucléotide simple brin XHb muté + XHa			
<i>Modèle à 1 mésappariement</i>			
XHb-M1A	5' -AGCTTGCATGACTGCAGGTCGACT		-3,5
XHb-M1B	5' -AGCTTGCATGCAATGCAGGTCGACT		-5,4
XHb-M2	5' -AGCTTGAATGCCTGCAGGTCGACT		-5,8
XHb-M4	5' -AGCTTGCATGCCTGAAGGTCGACT		-8,4
XHb-M5	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGTAAGACT		-7,2
<i>Modèle à 2 mésappariements</i>			
XHb-M1	5' -AGCTTGCATGAAATGCAGGTCGACT		-11,4
XHb-M1A-M2	5' -AGCTTGAATGACTGCAGGTCGACT		-9,9
XHb-M2-M4	5' -AGCTTGAATGCCTGAAGGTCGACT		-14,4
XHb-M4-M5	5' -AGCTTGCATGCCTGAAGGTAAGACT		-15,3
XHb-M2-M5	5' -AGCTTGAATGCCTGCAGGTAAGACT		-12,9
XHb-M1B-M4	5' -AGCTTGCATGCAATGAAGGTCGACT		-14,4
<i>Modèle à 3 mésappariements</i>			
XHb-M1A-M2-M4	5' -AGCTTGAATGACTGAAGGTCGACT		-19,5
XHb-M1A-M4-M5	5' -AGCTTGCATGACTGAAGGTAAGACT		-20,5
XHb-M2-M4-M5	5' -AGCTTGAATGCCTGAAGGTAAGACT		-22,0
<i>Modèle à 4-5 mésappariements</i>			
XHb-M1A-M2-M4-M5	5' -AGCTTGAATGACTGAAGGTAAGACT		-24,0
XHb-M1-M2-M4-M5	5' -AGCTTGAATGAAATGAAGGTAAGACT		-23,9
Oligonucléotide simple brin XHb délété + XHa			
XHb-D2	5' -AGCTTGAATGCCTGCAGGTCGACT		-7,0
XHb-D4	5' -AGCTTGCATGCCTGAGGTCGACT		-12,8
XHb-D5	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGTGACT		-9,0
XHb-D1	5' -AGCTTGCATGCTGCAGGTCGACT		-17,8
Oligonucléotide simple brin XHb avec sites abasiques + XHa			
XHb-AP2	5' -AGCTTGAATGCCTGCAGGTCGACT		-8,3
XHb-AP4	5' -AGCTTGCATGCCTGAGGTCGACT		-14,5
XHb-AP5	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGTGACT		-11,2

Tableau 5: Variation de la température de fusion (ΔT_m) de l'oligonucléotide XH incubé avec le composé S23906-1, S71344, S17887 ou muté par rapport à l'oligonucléotide non modifié.
 L'oligonucléotide XH db est incubé avec chacun des alkylants (S23906-1, S71344-1, S29385-1, S17887-1, ET-743) ou intercalant (Doxorubicine) [6]. Chacun des brins XHb mutés, délétés ou contenant des spacers est hybridé à un brin non muté. Les modifications du brin XHb sont surlignées en jaune. L'absorbance à 260nm est mesurée toutes les minutes de 20 à 100°C (1°C/min). $\Delta T_m = T_m$ XH seul - T_m XH modifié ou alkylé

Le mésappariement est le résultat d'une perte/diminution des liaisons hydrogènes, il engendre ainsi une modification plus ou moins importante de la structure de l'ADN. Le mésappariement CA ou CT est moins stable que le mésappariement GA ou GT (figure 47), puisque la formation de ponts hydrogènes moins stables est possible entre G et A ou G et T [275]. Le mésappariement GA a donc été choisi pour mimer la possible formation de deux liaisons hydrogènes entre la guanine alkylée et la cytosine du brin complémentaire (tableau 5).

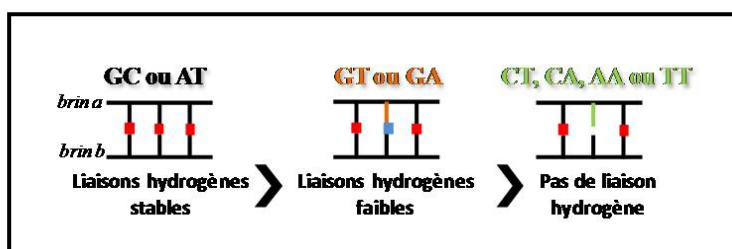
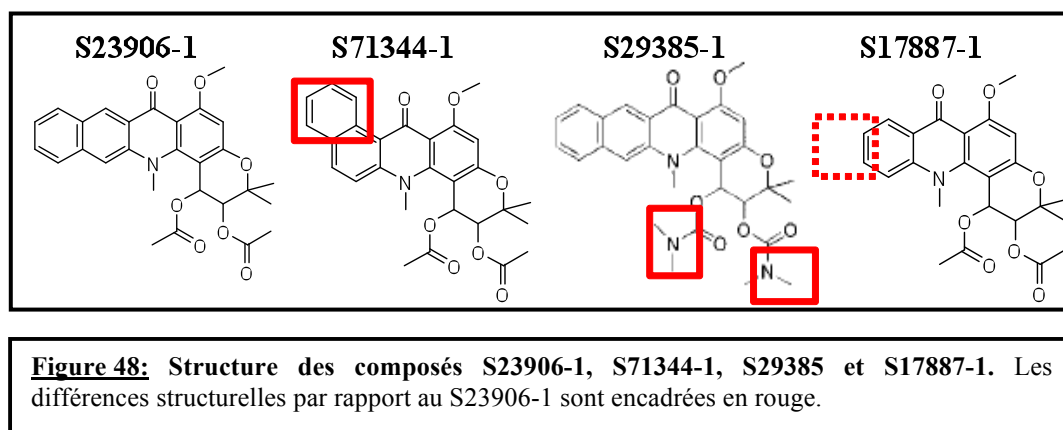


Figure 47: Stabilité de différentes paires de bases. Le duplex GT et GA est stabilisé par la formation de deux ponts hydrogènes, alors qu'aucune liaison n'est possible entre CT, CA, AA ou AT.

Le mésappariement induit des modifications du positionnement des bases impliquées. Les bases peuvent alors se retrouver à l'extérieur de l'hélice ou encore rester à l'intérieur, ce qui peut déstabiliser les ponts hydrogènes des bases adjacentes (figure 46) [276]. La présence d'un spacer est utilisée pour mimer l'externalisation des bases mésappariées ; une délétion produit, quant à elle, une courbure de la double hélice.

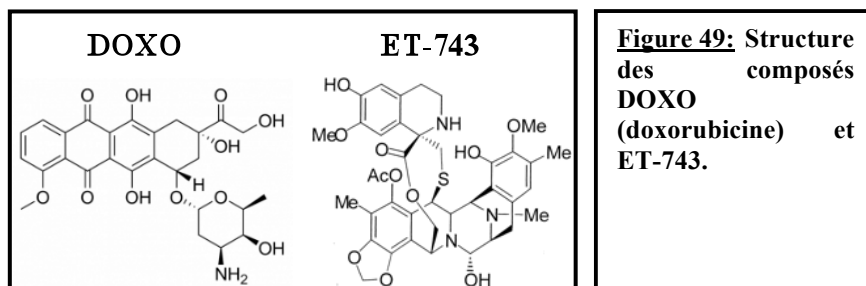
Les résultats exposés dans le *tableau 5* montrent qu'une modification (mutation, délétion ou spacer) au niveau des extrémités engendre globalement une déstabilisation moins importante de l'oligonucléotide par rapport à la modification centrale. La présence d'un site abasique déstabiliserait de manière plus importante l'ADN par rapport à une délétion, qui elle-même déstabiliserait de manière plus importante l'ADN par rapport à une mutation (déstabilisation : mutation < délétion < site abasique). Nous observons également que l'augmentation du nombre de mésappariements induit une augmentation de la déstabilisation de l'oligonucléotide.

La fixation des composés S23906-1, S71344-1, S29385-1 et S17887-1 provoque une diminution de la température de fusion de l'oligonucléotide XH double brin de 7,5°C pour les deux premiers, de 16°C et de 20°C respectivement pour les suivants (figure 33 et 48).

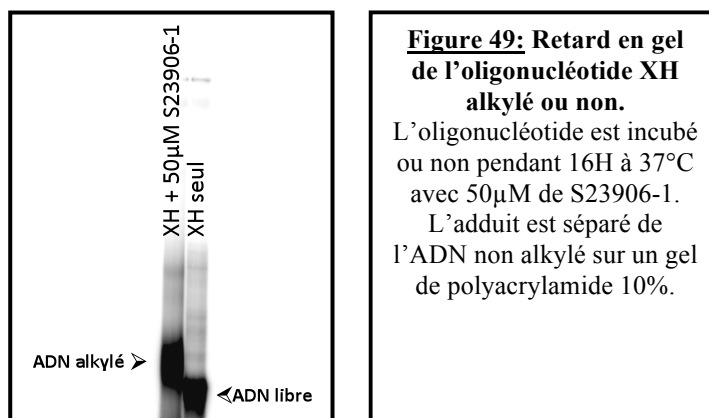


Ces composés alkylent également l'ADN à des taux différents : S29385-1 > S23906-1 ≥ S71344-1 > S17887-1 [6], un fort taux d'alkylation n'est donc pas forcément corrélé à une forte déstabilisation de l'ADN. Le taux de déstabilisation serait donc fonction de la structure du composé en lui-même plutôt qu'à l'intensité d'alkylation de l'ADN.

Les composés ET-743 et doxorubicine induisent quant à eux une stabilisation de la double hélice, puisqu'il faut 10 ou 20°C de plus pour obtenir 50% de fusion des deux brins (figure 33 et 49) [6].



En se référant aux résultats obtenus pour les oligonucléotides XH mutés, nous observons que la modification de la structure de l'ADN par le S23906-1 ou le S71344-1 induit la même déstabilisation qu'un mésappariement GC. La fixation du S29385-1 à l'oligonucléotide induirait quant à lui des modifications structurales correspondant à 2 mésappariements GC. Enfin, la fixation du S17887-1 induirait des modulations similaires à 3 mésappariements GC. Cependant ces résultats ne nous servent que de points de repères, puisque l'expérience est réalisée sur le pool total d'oligonucléotides. Il est en effet possible qu'une petite quantité d'ADN ne soit pas alkylé (figure 49). Ainsi, chacun des composés déstabiliserait peut-être d'avantage l'oligonucléotide XH.



Enfin, le S23906-1 est un *cis*-racémate, les études entreprises sur les isomères purs S27589-1 et S27590-1 ont montré l'importance de l'orientation du groupement acétate en position 1 (site réactif) des différents énantiomères [106]. Ainsi, le composé 1S (acétate en position 1 en conformation S) présente une activité cytotoxique et une activité antitumorale plus importante que le composé 1R, ce qui est corrélé à l'activité de déstabilisation plutôt qu'à l'activité d'alkylation de l'ADN. En effet, le composé 1S présente une capacité d'ouverture de la double hélice un peu plus importante que le composé 1R, alors que le 1R alkyle l'ADN de manière un peu plus efficace que le composé 1S.

Ces résultats sont exposés dans l'article Depauw et al. (Molecular Pharmacology, 2009) situé en annexe.

L'activité cytotoxique et antitumorale du S23906-1 est liée à sa capacité d'interaction à l'ADN, puisque le composé diol n'est pas actif *in vitro* ou *in vivo* (voir Chapitre I, 3.2). Les expériences réalisées, et notamment l'étude des énantiomères du S23906-1, montrent que cette activité cytotoxique et antitumorale est également corrélée au pouvoir de déstabilisation de la double hélice. Dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'action moléculaire du S23906-1, et ainsi les répercussions d'une ouverture locale de la double hélice, nous avons recherché les partenaires protéiques des adduits S23906-1/ADN.

2. Recherche des partenaires protéiques des adduits

S23906-1/ADN

Il a été montré dans la littérature que certaines protéines interagissent avec les adduits de l'ADN, en lien ou non avec l'activité cytotoxique de l'agent alkylant. C'est le cas des adduits du cisplatine reconnus par la HMG-B1, de ceux de l'ET-743 par la protéine XPG pour en empêcher la réparation ou encore des adduits CC-1065/ADN reconnus par la protéine DARP (Duocarmycin-DNA Adduct Recognizing Protein) [277]. Certains d'entre eux ont une activité plus spécifique puisqu'ils peuvent moduler la fixation de facteurs de transcription. Par exemple, l'ET-743 empêche la fixation de NF-Y [81], les conjugués platineII-acridine empêchent aussi la fixation des TBPs (TATA Binding Proteins) [278] ; au contraire les adduits formés par le cisplatine sont reconnus par le domaine C-terminal du suppresseur de tumeur p53 [279].

Afin d'identifier les partenaires protéiques (potentiellement des facteurs de transcription) des adduits S23906-1/ADN, notre étude a débuté par la recherche des facteurs de transcription dont la reconnaissance de leur cible nucléotidique est inhibée ou augmentée par la présence de l'adduit S23906-1/ADN.

2.1. Identification d'un site de fixation de facteurs de transcription ciblé par le S23906-1

2.1.1. Utilisation de membranes TranSignal™ Protein/DNA Array

Afin de déterminer l'activité potentielle du S23906-1 à inhiber ou à favoriser la fixation de facteurs de transcription, nous avons utilisé des membranes TranSignal™ Protein/DNA Array (Panomics) [280]. Ces membranes permettent la quantification de l'expression de certains facteurs de transcription. Ce kit a été détourné de son utilisation initiale afin d'étudier la spécificité d'alkylation du S23906-1 au niveau de séquences d'ADN consensus reconnues par les facteurs de transcription dans le but de déterminer ensuite les conséquences sur la transcription (activation ou inhibition). Cette technique présente également l'avantage d'effectuer un criblage large d'environ 400 facteurs de transcription, nous avons à disposition 5 kits TranSignal et chacun d'eux comprend 3 membranes identiques.

Les expériences d'interaction [facteur de transcription/séquence cible alkylée] en utilisant les membranes TranSignal™ nous ont permis d'observer plusieurs modulations de fixation de facteurs de transcription à leur site oligonucléotidique respectif selon que celui-ci soit alkylé ou non par le S23906-1. Chacune des séries de trois membranes (ADN non alkylé, ADN alkylé avec 1µM de S23906-1, ADN alkylé avec 5µM de S23906-1) est testée à trois reprises : les deux premières séries (duplicate) sont réalisées en incubant les oligonucléotides avec 15µg de protéines nucléaires et la dernière expérience est réalisée en absence de protéines avec une hybridation directe à la membrane des oligonucléotides contrôles ou alkylée par le S23906-1. Ce contrôle sans protéine nous permet d'éliminer les faux positifs ainsi que les faux négatifs : nous regardons ainsi si une variation se produit lors de l'hybridation du brin d'ADN alkylé au brin complémentaire déjà fixé sur la membrane, suggérant dans ce cas que la simple présence de l'adduit change la capacité d'interaction de l'ADN à son brin complémentaire.

La membrane TranSignal™ I montre une importante augmentation de fixation de protéines d'un facteur supérieur à 30, au niveau de l'oligonucléotide Smad-SBE (Smad Binding Element) alkylé par rapport au non alkylé (*figure 50 et tableau 6*). Cette différence suggère que l'oligonucléotide Smad-SBE alkylé forme un complexe protéique alors que l'oligonucléotide contrôle non alkylé n'est quasiment pas reconnu par des protéines d'extrait

nucléaire. La série de membranes contrôles (sans incubation avec les protéines d'extrait nucléaire) ne nous montre aucune augmentation d'hybridation de cet oligonucléotide : l'alkylation ne module donc pas l'hybridation du brin alkylé. La modulation de la reconnaissance de la séquence Smad-SBE est donc bien liée à la formation de complexes protéine/ADN alkylé.

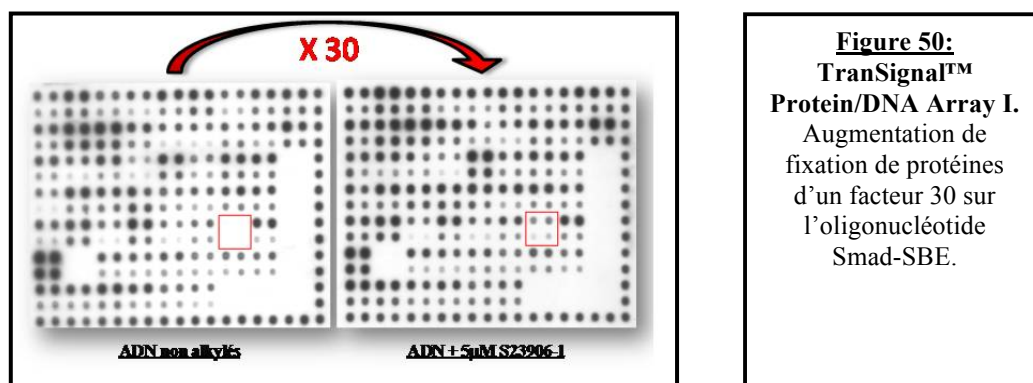


Figure 50:
TranSignal™
Protein/DNA Array I.
Augmentation de fixation de protéines d'un facteur 30 sur l'oligonucléotide Smad-SBE.

D'autres modulations de fixation de protéines sont observées sur les membranes TranSignal II à V. Un bilan des modulations de fixation de protéines sur les oligonucléotides spécifiques de chacune des membranes est présenté dans le tableau ci-dessous.

Nom de l'oligonucléotide	ADN + 1µM S23906-1	ADN + 5µM S23906-1	Nom de l'oligonucléotide	ADN + 1µM S23906-1	ADN + 5µM S23906-1
Membrane TranSignal I			Membrane TranSignal III		
Ets	1,11	3,92	CPE	4,6	4,2
Smad SBE	4,17	33,06	HEN1	5,4	5,1
Sp1	2,78	3,69	KTP1	1,78	2,33
Membrane TranSignal II			LR-1	5,65	2,75
AP3	1,15	3,87	MyoD	6,65	4,36
DR-5	2,18	3,93	MyTI	6,49	7,87
HBS	4,44	6,67	MZF1	12,81	7,51
HFH-2	2,15	5,93	PEBP	5,75	5,06
HNF-4	1,39	2,63	Membrane TranSignal IV		
KKLF*	4,03	12,02	Aucune modification		
MEF-2(1)	1,55	4,81			
MEF-3	7,25	9,49			
Nkx-2.5	1,75	7,58			
p300	2,05	6,86			
SRY	9,31	12,33	Membrane TranSignal V		
Tax/CREB	3,8	14,02	Msx 1/2/3	3,68	21,81
XRE	2,34	5,78	Oct4/Oct3	1,43	3,38
ZIA	1,64	3,84	PREB	3,65	13,7
ZIB	1,85	9,21	SRF	1,74	4,27
ZID	1,67	3,75	Tat	1,09	2,67

Tableau 6: Valeurs de modulation de fixation de protéines obtenues à partir des 5 membranes TranSignal. Les valeurs sont obtenues en comparant chacun des spots des membranes TranSignal™ Protein/DNA Array fixant des « ADN alkylés » et la membrane hybridant des « ADN non alkylés », l'expérience est réalisée à deux reprises. Les valeurs supérieures à 1 correspondent à une augmentation de fixation de protéines sur les oligonucléotides cibles alkylés par rapport aux oligonucléotides contrôles non alkylés. Les inhibitions (valeurs inférieures à 1) étant faibles, elles n'ont pas été retenues dans ce tableau.

Les membranes II et III présentent de nombreuses modulations de fixation de protéines. La membrane II montre trois augmentations de fixation de protéines d'un facteur supérieur à 10 (KKLF, SRY et Tax/CREB). Cependant, après comparaison des résultats avec la série contrôle de la membrane III (sans incubation des oligonucléotides avec les extraits nucléaires), nous observons une augmentation de fixation d'un facteur 24, pour le brin alkylé par 5 μ M de S23906-1 de l'oligonucléotide KKLF; et nous n'observons qu'une augmentation de fixation du brin complémentaire d'un facteur 12 en présence de protéines. Une diminution de fixation de protéines de l'ordre de 50% serait peut-être dissimulée derrière l'observation d'une augmentation de fixation. Les autres modulations sont quant à elles reproductibles et indépendantes de la capacité d'interaction des séquences complémentaires. La membrane IV ne présente aucune modification de fixation de protéines sur les oligonucléotides alkylés. Enfin, la membrane V présente des oligonucléotides fixant de manière importante des protéines lorsque ceux-ci sont alkylés, notamment l'oligonucléotide msx 1/2/3. L'étude de la reconnaissance de cet oligonucléotide sera également très intéressante puisque sa reconnaissance par des protéines augmente d'un facteur 20. L'expérience sans protéine n'a pas révélé de différences.

Il est à noter que nous n'observons pas de changement de la capacité d'interaction à l'ADN des facteurs de transcriptions TBP (comme observé pour le cisplatine) ou NF-Y (comme observé pour l'ET-743).

Pour résumer, un grand nombre de modulation de fixation de facteurs de transcription est mis en évidence (*tableau 6*), les plus intéressantes étant la modulation observée au niveau de l'oligonucléotide Smad-SBE et de l'oligonucléotide Msx 1/2/3. Notre étude a donc débuté par l'utilisation de Smad-SBE comme cible oligonucléotidique pour l'étude des protéines recrutées au niveau de l'adduit ADN/S23906-1. Il serait intéressant pour la suite du projet de regarder également quelles types de protéines sont recrutées au niveau de Msx 1/2/3. De même, il faudra vérifier si certaines protéines ont leur fixation empêchée au niveau de KKLF, et surtout l'importance de cette séquence (5'- GGGGAGGAGGGGGAGGAGGGGGAGGAG-3')

dans la reconnaissance du S23906-1.

2.1.2. Protéines ciblant la séquence Smad-SBE

En utilisant le logiciel PATCH™ public 1.0 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#patch>), les sites de reconnaissance de différents facteurs de transcription au sein de l'oligonucléotide Smad-SBE ont été mis en évidence comme indiqué dans la figure 51.

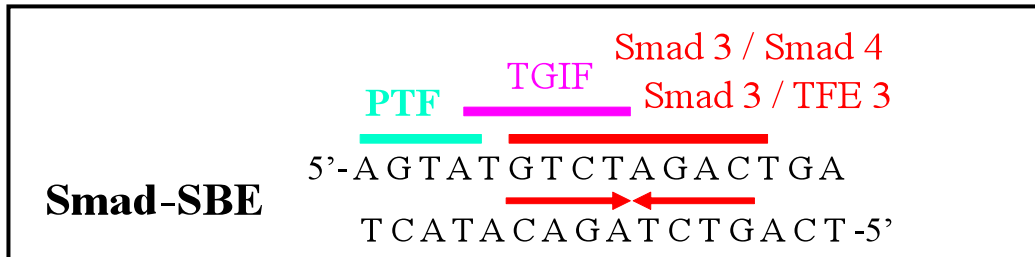


Figure 51: Protéines susceptibles de se fixer sur Smad-SBE. La séquence palindromique GTCTAGAC est reconnue par le complexe humain Smad3/Smad4, la séquence TGCT chevauchant en partie le site consensus du complexe Smad3/4 est reconnue par la protéine humaine TGIF (TG-interacting factor). Cette recherche informatique de sites consensus a également révélé que cet oligonucléotide était la cible de protéines d'autres espèces, comme le complexe murin Smad3/TFE3 et la protéine de rat PTF.

Les protéines Smads appartiennent à une famille de facteurs de transcription permettant la transmission du signal intracellulaire induit par le TGF- β (Transforming Growth Factor-béta) régulant ainsi la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Il existe huit protéines Smads chez l'homme. Smad 1, 2, 3, 5 et 8 sont des substrats directs des récepteurs de la famille TGF- β ; Smad 4 est un co-partenaire des Smads ; Smad 6 et 7 sont des inhibiteurs de Smads [281]. Plusieurs centaines de gènes sont régulés par TGF- β , dont 2/3 sont activés par le signal et 1/3 sont réprimés. Les cofacteurs d'interaction des Smads à l'ADN sont FoxH1, Mixer, E2F4, FoxO alors que p300 est un co-activateur [281].

Les Smads orchestrent les modifications des histones et le remodelage de la chromatine pour activer la transcription [282]. Smad 4 est essentiel pour augmenter l'expression de Bmf et Bim (membres de la famille des pro-apoptotiques Bcl-2) et ainsi induire l'apoptose des cellules [283]. L'association de Smad 3 à Smad 4 permet leur interaction à des zones promotrices de certains gènes et facilite la fixation de Sp1 pour augmenter l'expression des gènes d'inhibiteurs de cdk tel que *p21* [284]. Smad 3 peut se fixer à la séquence Smad-SBE du gène *sm22* en association avec SRF, et ainsi être impliqué dans la différenciation myofibroblastique [285]. SRF est impliqué également dans l'apoptose et la prolifération puisqu'il peut aussi au contraire inhiber la fixation de Smad 3 sur la région promotrice de *p15* et *p21* [286].

Ces données de la littérature montrant que Sp1 et SRF peuvent s'associer avec les protéines Smads et interagir avec Smad-SBE [284, 285, 287] ont particulièrement retenu notre attention car nous observons aussi une augmentation de formation de complexe protéines/ADN sur les séquences consensus de ces deux facteurs de transcription (*tableau 6*). Cependant, aucune augmentation des capacités de liaison des protéines reconnaissant la séquence « Smad3/4 » n'est présente sur la membrane. Cela s'expliquerait par le fait que les cellules HT-29 (carcinome de côlon humain) utilisées pour nos expériences n'expriment pas la protéine Smad 4 [288].

L'alkylation a donc permis l'activation de la reconnaissance de ce site par certaines protéines qui pourraient être les facteurs de transcription de la famille Smad (sauf Smad 4) ou alors d'autres protéines qui empêcheraient ou favoriseraient la fixation de ces facteurs de transcription. La formation de l'adduit Smad-SBE/S23906-1 dans cette voie signalétique aurait des répercussions sur l'induction de l'apoptose ou sur la prolifération des cellules. Il était donc important d'identifier les protéines recrutées au niveau de cette séquence alkylée.

2.1.3. Vérification de l'alkylation de Smad-SBE par le S23906-1

Dans un premier temps, nous avons testé la capacité d'alkylation du S23906-1 sur l'oligonucléotide Smad-SBE. Pour cela nous avons utilisé les propriétés de fluorescence du composé (λ excitation 354nm, λ émission 420 à 650nm [114]) (*figure 52*). Une expérience de retard en gel permet également de visualiser l'adduit Smad-SBE/S23906-1, qui va être retardé (*figure 53*).

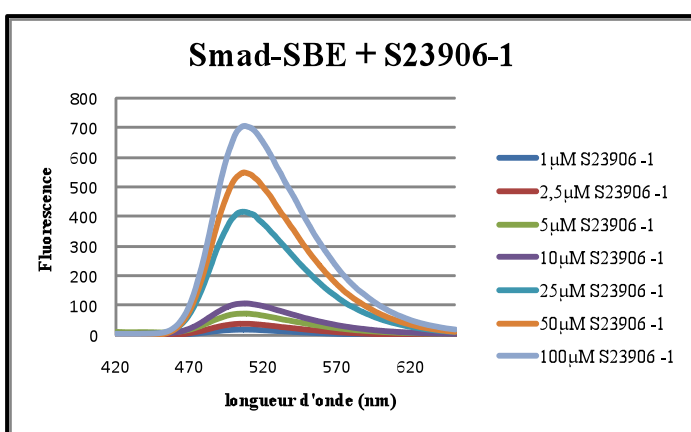
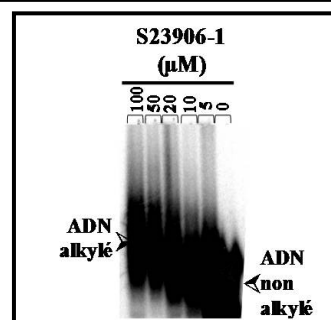


Figure 52: Spectre de fluorescence du S23906-1 fixé à l'oligonucléotide Smad-SBE. L'oligonucléotide est incubé avec des concentrations croissantes en S23906-1 pendant 16H à 37°C. Après précipitation de l'ADN, l'intensité de fluorescence du S23906-1 lié à la séquence Smad-SBE, est mesurée (λ excitation=354nm)

Figure 53: Retard en gel montrant l'alkylation de Smad-SBE par le S23906-1. L'oligonucléotide Smad-SBE est incubé pendant 16H avec des concentrations croissantes en S23906-1. L'ADN alkylé est visualisé par un retard de l'adduit sur un gel d'acrylamide 10%.



Ainsi, le composé S23906-1 interagit de manière covalente avec l'oligonucléotide Smad-SBE. Après observation d'interaction de protéine(s) d'extraits nucléaires de cellules HT-29 sur Smad-SBE alkylé par rapport au non alkylé (*voir figure 62*), nous avons utilisé notre approche de protéomique pour identifier le(s) partenaire(s).

2.2. Recherche du/des partenaire(s) protéique(s)

2.2.1. Protéines recrutées sur l'oligonucléotide Smad-SBE

Les protéines qui se fixent à l'ADN alkylé par le S23906-1 ont été isolées par un système chromatographique où l'oligonucléotide d'intérêt biotinylé est alkylé ou non par le S23906-1. Cet oligonucléotide est fixé sur des colonnes de chromatographie via l'interaction streptavidine/biotine. Les protéines d'extraits nucléaires de cellules HT-29 qui se fixent à l'ADN sont éluées par des concentrations croissantes en NaCl (50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 500 et 1000 mM), dessalées puis séparées par électrophorèse monodimensionnelle (1D). Les spots d'intérêt sont récupérés, la ou les protéine(s) contenue(s) dans ceux-ci sont digérés par la trypsine puis les peptides sont analysés par MALDI-TOF (Voyager), en mode positif. Les spectres obtenus sont ensuite comparés à une banque de données (Profound). Les protéines identifiées sont enfin analysées par PeptideMass, un logiciel permettant la détermination des points de coupure tryptique.

L'électrophorèse réalisée sur les protéines éluées des colonnes de chromatographie montre deux bandes qui apparaissent avec un différentiel de fixation de protéine(s) entre l'oligonucléotide non alkylé et alkylé (*spot 1 et 2, figure 54*).

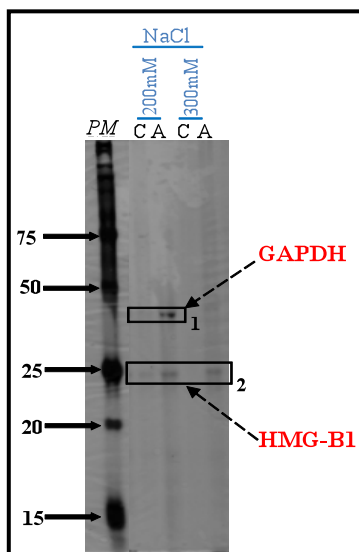
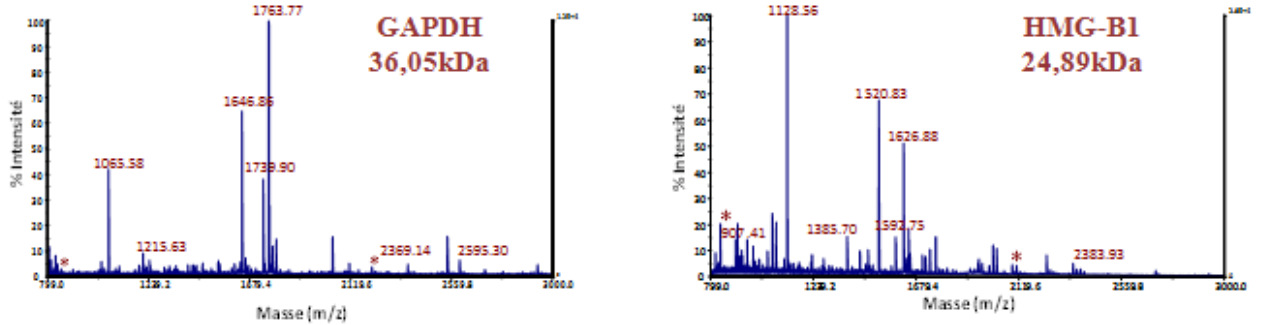


Figure 54: Electrophorèse 1D des différents éluas de la chromatographie d'affinité. Les éluas de la colonne correspondant à l'oligonucléotide Smad-SBE alkylé sont notés « A » ou non alkylé sont notés « C » (contrôle). L'interaction Smad-SBE/protéines est déstabilisée en présence de 200 et 300mM de NaCl. On observe une fixation préférentielle de protéines lorsque l'oligonucléotide est alkylé. L'analyse MALDI-TOF a permis d'identifier la GAPDH et la HMG-B1. PM : marqueur de poids moléculaire (KDa).

Ce gel confirme la fixation préférentielle de protéines observées au niveau de Smad-SBE alkylé sur les membranes TranSignal™. Contre toute attente, l'analyse MALDI-TOF ne nous révèle pas la présence de protéines Smads (environ 43KDa) ou des facteurs suspectés (figure 51) sur cet oligonucléotide mais plutôt celle de la GAPDH (Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) et de la HMG-B1 (High Mobility Group-B1) respectivement à 37 et 24KDa (figure 55).



Pics (masse observée)	Pics (masse théorique)	Séquence peptidique
1065.58	1065.59	¹⁰⁶ AG ¹¹⁸ AHLQGGAKR ¹¹⁸
1215.63	1215.64	¹²⁷ TV ¹³⁷ DG ¹⁴⁷ PSGKLR ¹³⁷
1646.86	1645.90	²⁰⁰ VI ²¹⁰ PELN ²²⁰ GKLTGMAFR ²¹⁴
1739.90	1739.93	¹⁹⁴ GR ²⁰⁴ GALQNI ²¹⁴ PASTGAAK ²¹⁴
1763.77	1763.80	²¹⁰ LIS ²²⁰ WYDNEFGYSNR ²²³
2369.14	2369.21	¹¹² RV ¹²² ISAPSADAPMFV ¹³² MGVNHEK ¹²⁹
2595.30	2595.35	¹⁴² VI ¹⁵² HDNFGIVEGLMTTV ¹⁶² HAIATQRT ¹⁴⁶
*	Pics d'autolyse trypsique	

Pics (masse observée)	Pics (masse théorique)	Séquence peptidique
907.41	907.49	¹⁴² DIAAYRAK ¹⁴²
1128.56	1128.56	¹⁴² YEK ¹⁵² DIAAYR ¹⁴²
1385.70	1385.70	¹⁴² EKYEK ¹⁵² DIAAYR ¹⁴²
1520.83	1520.84	¹¹² PK ¹²² IKGEHPGLSIGDVAK ¹²⁷
1592.75	1592.73	²⁰ KHPDASVNFSEFSK ⁴⁵
	1592.77	²¹ HPDASVNFSEFSK ⁴⁴
	1592.77	¹²³ KL ¹³³ GEMV ¹⁴³ NNTAADDK ¹⁴¹
1626.88	1626.88	¹⁴¹ LKEKYEK ¹⁵¹ DIAAYR ¹⁴²
2383.93	2382.12	²¹ HPDASVNFSEFSK ⁴⁴ KCSERWK ³⁰
*	Pics d'autolyse trypsique	

Human Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (P04406 GAPDH) :

¹⁰ MGKVKVGVNG ²⁰ FGRIGRLVTR ³⁰ AAFNSGKVDI ⁴⁰ VAINDPFIDL ⁵⁰ NYMVYMFQYD
⁶⁰ STHGKPHGTV ⁷⁰ KAENGKLVIN ⁸⁰ GNPITIFQER ⁹⁰ DPSKIKWGDA ¹⁰⁰ GA EYVVESTG
¹¹⁰ VFTIMEKAGA ¹²⁰ HLQGGAKRVI ¹³⁰ ISAPSADAPM ¹⁴⁰ FVMGVNHEKY ¹⁵⁰ DNSLKIISNA
¹⁶⁰ SCTTNC LAPL ¹⁷⁰ AKVIHDNFGI ¹⁸⁰ VEGLMTTVHA ¹⁹⁰ ITATQKTVDG ²⁰⁰ PSGLKLRDGR
²¹⁰ GALQNIIPAS ²²⁰ TGAAKAVGRV ²³⁰ IPELNKLTG ²⁴⁰ MAFRVPTANV ²⁵⁰ SVVDLTCRLE
²⁶⁰ KPAKYDDIKK ²⁷⁰ VVKQASEGPL ²⁸⁰ KGILGYTEHQ ²⁹⁰ VVSSDFNSDT ³⁰⁰ HSSTFDAGAG
³¹⁰ IALNDHFVKL ³²⁰ ISWYDNEFGY ³³⁰ SNRVVDLMAH MASKE

Human High mobility group protein B1 (P09429 HMGBl) :

¹⁰ MGKGDPKPR ²⁰ GKMSYAFFV ³⁰ QTCREEHKKK ⁴⁰ HPDASVNFSE ⁵⁰ FSKKCSERWK
⁶⁰ TMSAKEKGF ⁷⁰ EDMAKADKAR ⁸⁰ YEREMKTYIP ⁹⁰ PKGETKKKFK ¹⁰⁰ DPNAPKRPPS
¹¹⁰ AFFLFCSEYR ¹²⁰ PKIKGEHPGL ¹³⁰ SIGDVAKKLG ¹⁴⁰ EMNNTAADD ¹⁵⁰ KQPYEKKAAR
¹⁶⁰ LKEKYEKDIA ¹⁷⁰ AYRAKPKPDA ¹⁸⁰ ARKGVVKAER ¹⁹⁰ SKKKKEEED ²⁰⁰ EDEEDEEEE
²¹⁰ EDEEDEEEE ²²⁰ IDDE

Figure 55 : Identification de la GAPDH et de la HMG-B1. Les tableaux regroupent l'ensemble des masses de pics retrouvés sur le spectre MALDI-TOF. L'analyse Profound indique que les 7 peptides de chacun des spectres (dont tous les pics majeurs) correspondent aux séquences peptidiques de la GAPDH (34% de recouvrement) et de la HMG-B1 (31% de recouvrement). Ces peptides sont inscrits en rouge dans les séquences peptidiques entières de la GAPDH et de HMG-B1 humaine.

2.2.2. HMG-B1, une protéine aux multiples fonctions nucléaires

La protéine HMG-B1 est une protéine abondante dans le noyau des cellules de mammifères (1 pour 10 à 20 nucléosomes). Elle contient deux « domaines HMG » (14-74 et 100-160) et une queue chargée négativement (riche en résidus aspartate/glutamate) [289]. De manière générale, les protéines à « domaine HMG » sont des protéines chromosomales non-histones qui se lient à des structures spécifiques déroulées ou courbées de l'ADN ou à la chromatine plutôt qu'à des séquences spécifiques [290, 291]. En plus de leur rôle structural, les protéines HMG-B1 et B2 sont connues pour être recrutées au niveau de certains dommages à l'ADN, comme par exemple les crosslinks psoralen/ADN [292], les adduits benzo[a]pyrene diol époxydes [293] ou encore les adduits cisplatine/ADN [60, 294], qui vont déstabiliser la double hélice. De plus, des expériences *in vitro* ont montré que la reconnaissance de ce dernier adduit par la HMG-B1 empêche la fixation de XPG et donc la réparation NER [61, 295]. Elle joue également un rôle important dans la réparation de l'ADN [296-300]. Elle est aussi impliquée dans la voie MMR indépendante de MutS où elle reconnaît la lésion thiopurine et permet le recrutement des autres protéines de cette voie telles que : HMG-B2, HSC-70, Erp60 et la GAPDH [301, 302]. De manière intéressante, nos expériences ont permis l'identification de la GAPDH contenue dans ce complexe. Enfin, la HMG-B1 est impliquée dans la réplication et la transcription de l'ADN [298, 303-305].

2.2.3. Localisation nucléaire de la GAPDH

Comme souligné dans l'introduction, la GAPDH présente une localisation cellulaire très variée en lien avec ses multiples fonctions qui conduiront soit au maintien de la prolifération cellulaire, soit à l'induction de l'apoptose. Au niveau nucléaire, la GAPDH interagit avec l'ARNm, l'ARNt, l'ADN double brin (ADNdb) ou simple brin (ADNsb), mais aussi avec certains adduits de l'ADN.

Bien qu'il ait été montré à plusieurs reprises que la GAPDH présentait des fonctions nucléaires, nous avons vérifié la présence de GAPDH au sein des noyaux des cellules HT-29 et A549 (adénocarcinome de cellules épithéliales basales alvéolaires humaines). Une extraction fractionnée (kit biovision) suivie d'un western-blot a été réalisée (*figure 56*).

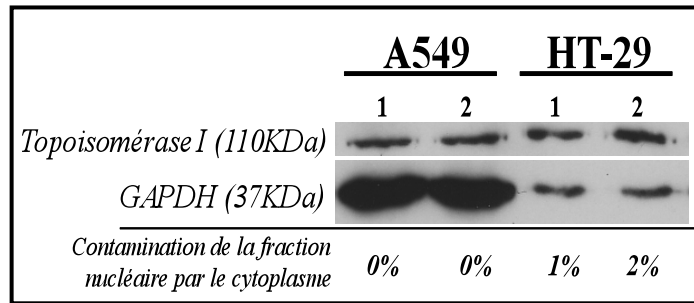


Figure 56: Identification de la localisation nucléaire de la GAPDH par Western-blot.

Les expériences sont réalisées en duplicate (points 1 et 2 sur la figure). La topoisomérase I est utilisée comme contrôle de dépôt. La contamination de la fraction nucléaire par la fraction cytoplasmique, est évaluée par un dosage de la β -galactosidase. 10 μ g de protéines de fractions nucléaires de cellules A549 ou HT-29 sont déposées par puits.

Nous observons la présence de GAPDH nucléaire pour chacune des lignées, mais en quantité moins importante pour HT-29. Il a déjà été montré qu'au sein du noyau de certaines cellules, la GAPDH interagissait avec l'ADN, notamment au niveau des télomères (voir Introduction 4.6). Nous avons alors vérifié l'interaction de la GAPDH à la chromatine dans nos deux lignées cellulaires (figure 57).

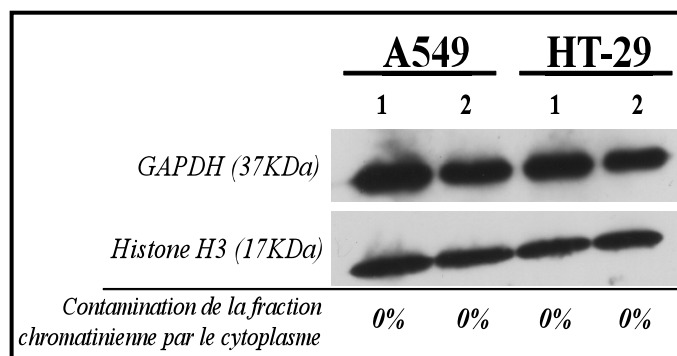


Figure 57: Identification de l'interaction de la GAPDH à la chromatine des cellules HT-29 et A549 par Western-blot.

Les expériences sont réalisées en duplicate (points 1 et 2 sur la figure). L'Histone H3 est utilisée comme contrôle de dépôt. La contamination de la fraction chromatinienne par la fraction cytoplasmique est évaluée par un dosage de la β -galactosidase. 10 μ g de protéines de fractions chromatiniennes de cellules A549 ou HT-29 sont déposées par puits.

Ces expériences valident la présence de GAPDH dans nos extraits nucléaires de cellules HT-29 et ainsi la possibilité d'une interaction de la GAPDH avec notre oligonucléotide Smad-SBE. De plus, la GAPDH qui interagit de manière différente entre Smad-SBE alkylé et non alkylé pourrait être une GAPDH de type nucléaire.

2.3. Validation des interactions

L'étape suivante est la validation des interactions entre l'ADN et les protéines identifiées. Pour cela nous avons utilisé la technique de retard en gel.

2.3.1. Interaction HMG-B1/Smad-SBE alkylé ou non

Les expériences réalisées avec la HMG-B1 pure humaine n'ont pas montré d'interaction directe avec l'oligonucléotide Smad-SBE alkylé ou non, ceci même en présence de GAPDH. La présence de HMG-B1 lors de la purification des protéines pourrait s'expliquer par une interaction indirecte via une protéine intermédiaire non identifiée. Nous avons ensuite testé la fixation d'anticorps anti-HMG-B1 contre le complexe formé par l'oligonucléotide et les protéines d'extraits nucléaires. Cependant aucun supershift n'a été obtenu, suggérant que la protéine HMG-B1 serait peut-être absente du complexe protéique interagissant avec l'adduit S23906-1/ADN.

2.3.2. Interaction GAPDH/Smad-SBE alkylé ou non

Nous avons ensuite validé l'interaction de la GAPDH pure avec l'oligonucléotide Smad-SBE alkylé. Au début de notre étude, la GAPDH d'érythrocyte humain n'était pas disponible dans le commerce. Nos expériences ont donc tout d'abord été réalisées avec de la GAPDH purifiée de cellules d'autres espèces animales (muscle de lapin et muscle de poulet), qui présentent de fortes similarités structurales avec la GAPDH humaine, puis validées plus tard avec la GAPDH purifiée d'érythrocyte humain.

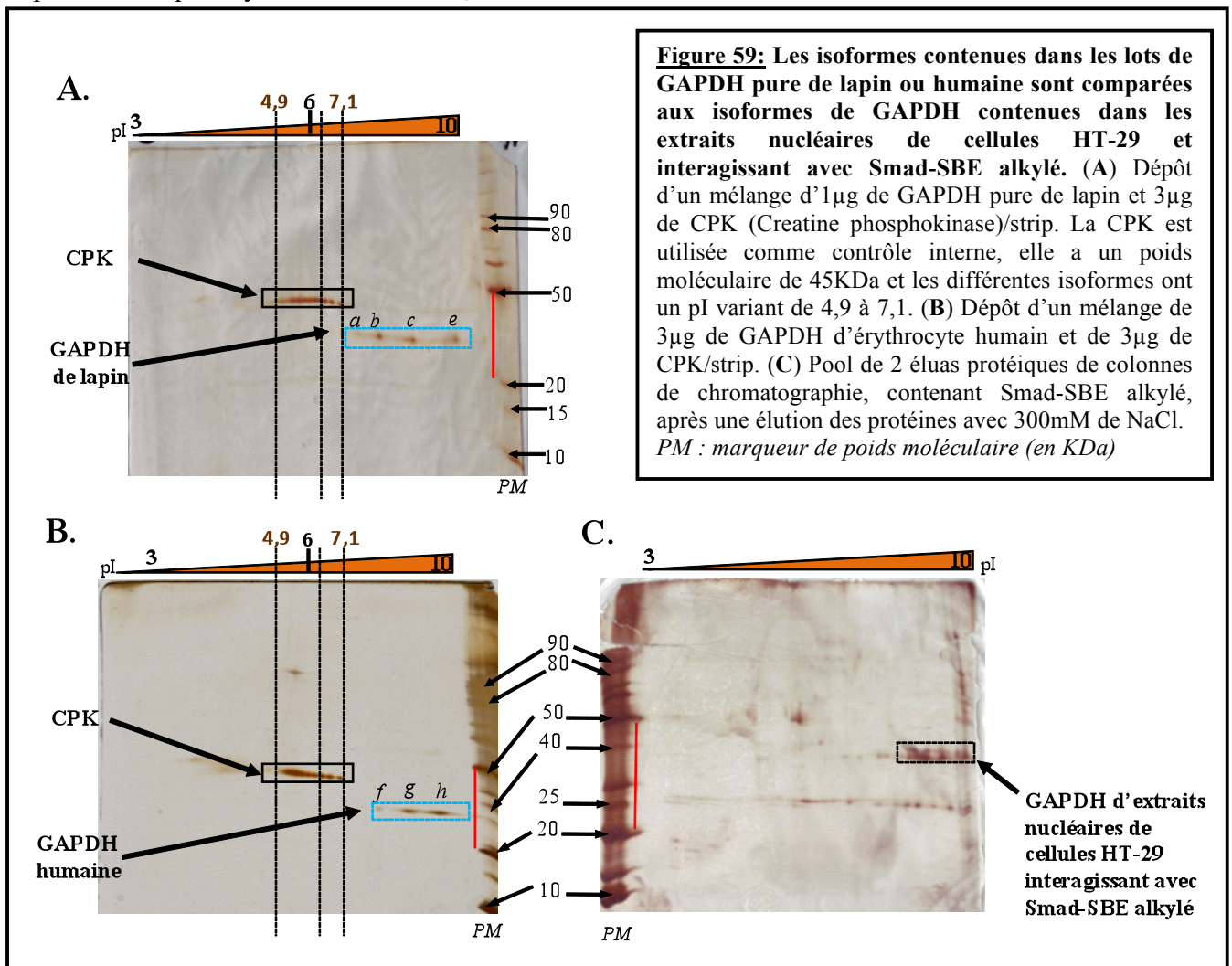
2.3.2.1. Alignement des séquences protéiques des GAPDHs

A l'aide du logiciel « EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms », nous avons aligné les séquences peptidiques de la GAPDH de chacune des espèces (*figure 58*). Nous observons un haut taux d'identité et de similarité entre chacune d'elles:

- 94,3% d'identité et 96,1% de similarité entre la GAPDH humaine et de lapin,
- 91,3% d'identité et 94,3% de similarité entre la GAPDH humaine et de poulet,
- 93,7% d'identité et 96,4% de similarité entre la GAPDH de lapin et de poulet.

2.3.2.2. Isoformes de la GAPDH

Il est important de rappeler aussi que la structure de la GAPDH peut varier entre différentes espèces, différents tissus, mais aussi au sein d'une même cellule puisque la GAPDH peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles (voir introduction 4.2.4). Le poids moléculaire de la GAPDH peut varier de 35 à 54 kDa et le pI de 7,0 à 8,7 selon sa localisation cellulaire. La GAPDH nucléaire présente en général un pI de 8,3-8,7 alors que l'isoforme cytoplasmique est plus acide avec un pI autour de 7,0-7,5 [162]. Afin de connaître le pI des GAPDH pures du commerce qui ont été utilisées dans les expériences de retard en gel, nous avons réalisé des gels d'électrophorèse bidimensionnelle. Ceux-ci pourront alors être comparés aux gels séparant les isoformes de GAPDH présentes dans la fraction nucléaire de cellules HT-29 et qui interagissent avec Smad-SBE alkylé (figure 59). Malheureusement, nous n'avons pas eu assez de matériel pour tester la GAPDH de muscle de poulet qui n'était alors plus vendue dans le commerce, mais d'après Sirover [127] celle-ci présente un pI moyen de l'ordre de 8,5.



Les isoformes contenues dans le pool de GAPDH humaine (*figure 59B*) sont un peu plus basiques que certaines contenues dans le pool de GAPDH de lapin (*figure 59A*) et pourraient correspondre aux formes nucléaires. Par comparaison des gels d'électrophorèse 2D, les isoformes humaines contenues dans les extraits nucléaires interagissant avec Smad-SBE (*figure 59C*) paraissent également plus basiques que celles de GAPDH de lapin. Les modifications post-traductionnelles permettraient éventuellement à ces isoformes d'interagir plus ou moins bien avec l'ADN.

2.3.2.3. Retard en gel et quantification de l'interaction Smad-SBE double brin/GAPDH

En effet, nous observons que la GAPDH de chacune des espèces se fixe préférentiellement à Smad-SBE double brin alkylé par le S23906-1 par rapport au non alkylé, mais aussi que la GAPDH humaine se fixe de manière plus importante à l'ADN par rapport aux isoformes de GAPDH des autres espèces (*figure 60*).

La différence de pI observée entre la GAPDH humaine et de lapin (*figure 59*) pourrait expliquer la plus faible interaction de la GAPDH de lapin à l'ADN double brin alkylé par rapport à la GAPDH humaine, un pI basique améliorerait l'interaction de la protéine à l'ADN.

Enfin, même si nous observons une fixation un peu moins importante de la GAPDH de lapin ou de poulet sur Smad-SBE alkylé par rapport à la GAPDH humaine, les courbes de fixation sont équivalentes. Les expériences réalisées avec chacune d'elles pourront alors être comparées.

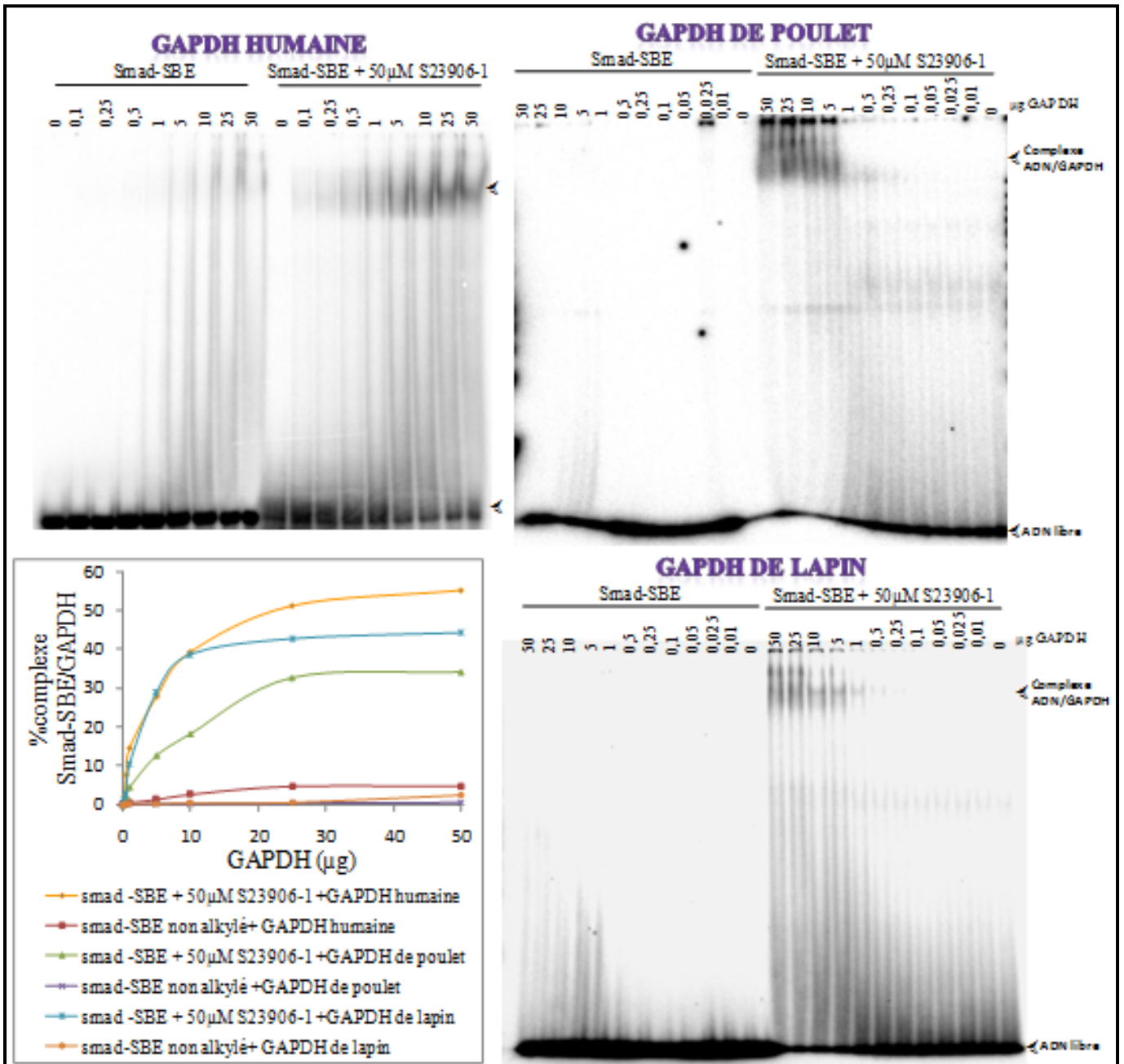
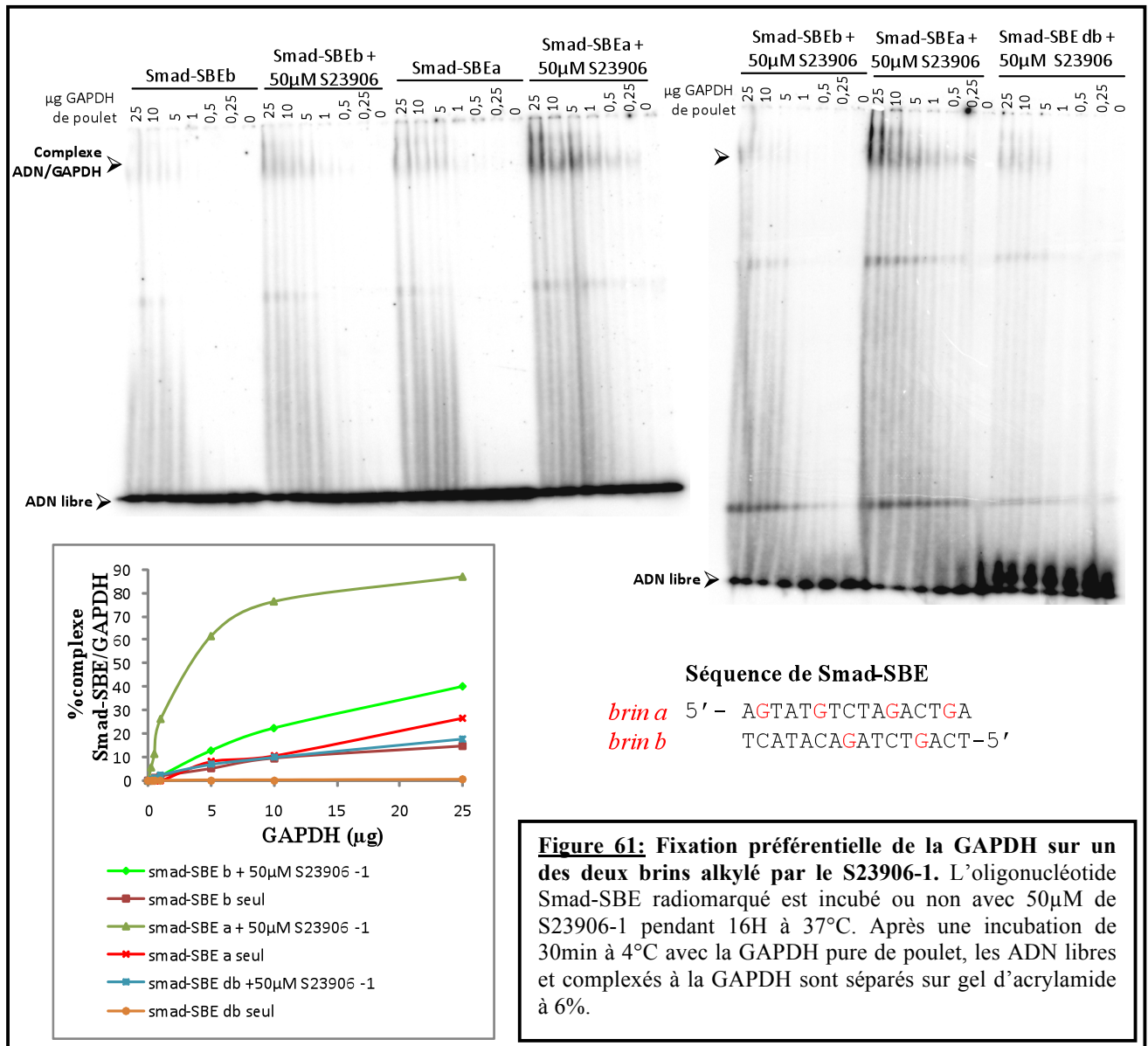


Figure 60: Fixation préférentielle de la GAPDH sur l'oligonucléotide double brin alkylé par le S23906-1. L'oligonucléotide Smad-SBE radiomarqué est incubé ou non avec 50µM de S23906-1 pendant 16h à 37°C. Après une incubation de 30min à 4°C avec la GAPDH pure humaine, les ADN libres et complexés à la GAPDH sont séparés sur gel d'acrylamide à 6%. Les taux d'interaction entre la GAPDH et Smad-SBE sont regroupés dans le graphique.

2.3.2.4. Retard en gel et quantification de l'interaction Smad-SBE/GAPDH

Il faut rappeler que le S23906-1 présente la capacité d'ouverture locale de la double hélice, il induit alors de l'ADN simple brin. Nous avons vérifié la capacité de fixation de la GAPDH à Smad-SBE simple brin, alkylé ou non.



De la même manière que pour l'ADNdb, nous observons une fixation préférentielle de la GAPDH à l'ADN simple brin alkylé par rapport au simple brin non alkylé (figure 61). Nous observons également que la GAPDH se fixe de manière plus importante à l'oligonucléotide simple brin *Smad-SBEa* alkylé par rapport à *Smad-SBEb* alkylé (figure 61). On remarque que le *brin a* présente deux fois plus de guanine que le *brin b*. La fixation plus importante de la GAPDH sur ce *brin a* pourrait s'expliquer par le fait qu'il est deux fois plus alkylé par le

S23906-1. La deuxième hypothèse est une possible spécificité de séquence pour la fixation de la GAPDH, puisque le *brin a* non alkylé interagit lui aussi plus fortement avec la GAPDH par rapport au *brin b* non alkylé.

Nous avons alors comparé la fixation de la GAPDH entre les *brins a et b* alkylés et Smad-SBE double brin alkylé. La GAPDH présente une fixation préférentielle sur le *brin a* par rapport au *double brin*. La présence de S23906-1 augmenterait la fixation de la GAPDH sur l'oligonucléotide mais ne déstabiliserait pas entièrement les deux brins pour engendrer du simple brin et augmenter ainsi une plus forte fixation de la GAPDH.

2.3.3. Interaction GAPDH/autres séquences alkylées ou non

Afin de conforter les résultats précédents et de savoir si la GAPDH se fixerait sur une séquence particulière, nous avons testé la capacité de fixation de cette protéine à un adduit S23906-1/ADN en utilisant d'autres séquences oligonucléotidiques (*figure 62*). La séquence Msx présentait une forte modulation de fixation de protéines au niveau des membranes TranSignal™ alors que les séquences Pit-1 et NF-1 n'en montraient aucune (*tableau 6*).

Smad-SBE	5' - AGTATG ^T CTAGACTGA TCATACAGATCTGACT-5'	Figure 62: Séquences oligonucléotidiques de Smad-SBE, Msx, Pit-1 et NF-1. Les guanines sont notées en rouges puisqu'elles sont des cibles potentielles du S23906-1.
Msx	5' -GGCGAATTAGGAATTAGG CCGCTTAATCCTTAATCC-5'	
Pit-1	5' -TGTCTTCTCTGAATATGAATAAGAAATAA ACAGAAGGACTTATACTTATTCTTTATT-5'	
NF-1	5' -TTTTGGATTGAAGCCAATATGATAA AAAACCTAACTTCGGTTATACTATT-5'	

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'interaction des protéines d'extraits nucléaires pour chacun de ces oligonucléotides alkylés ou non.

Les gels présentés dans la *figure 63* confirment la modulation de fixation des protéines d'extraits nucléaires, observée précédemment au niveau des membranes TranSignal™. Nous voyons en effet que les protéines d'extraits nucléaires ne se fixent pas sur Msx et Smad-SBE non alkylé alors qu'elles s'y fixent lorsque l'oligonucléotide est alkylé. Au contraire, des protéines identiques sont recrutées à la fois sur NF-1 alkylé et non alkylé.

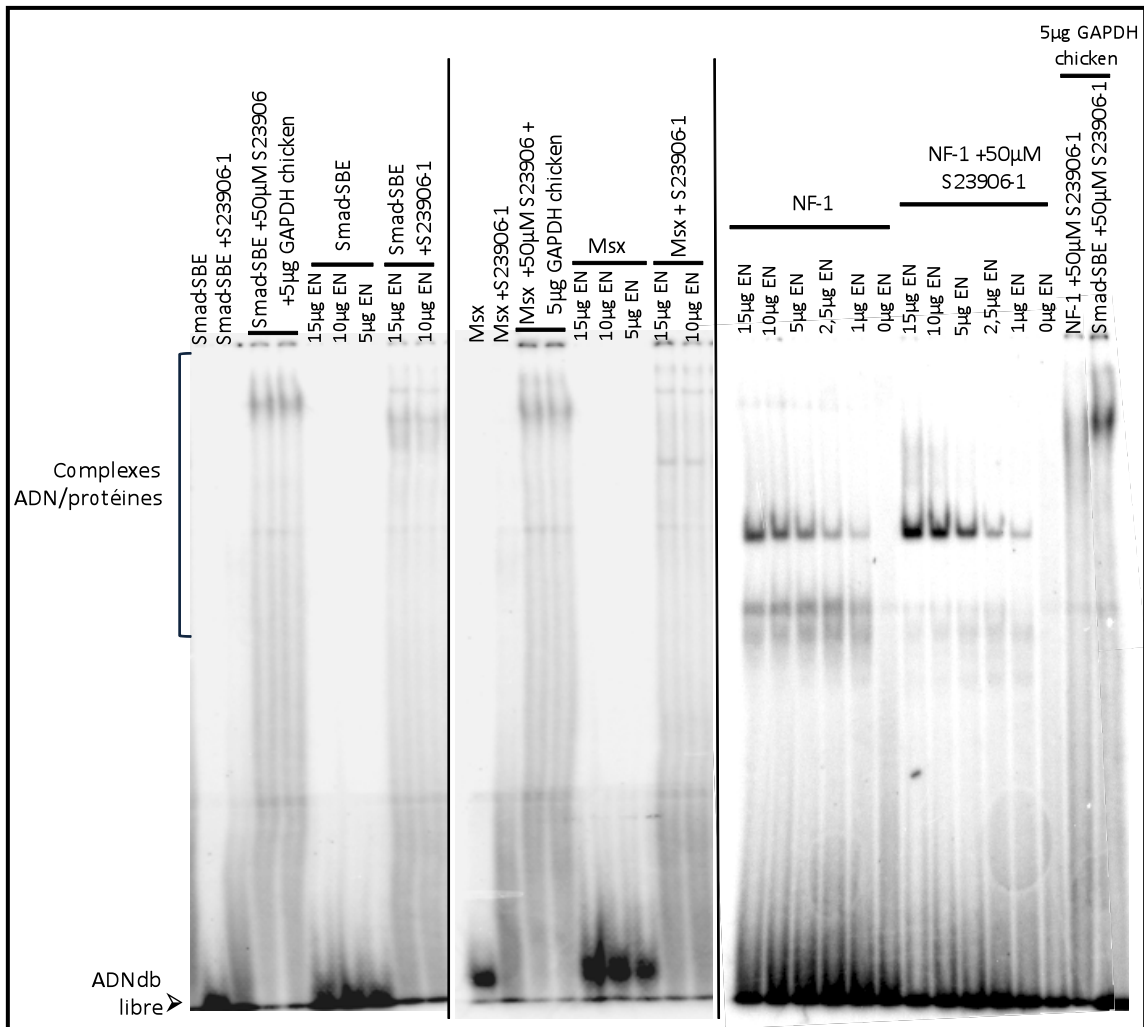


Figure 63: Fixation des protéines d'extraits nucléaires (EN) de cellules HT-29 et de la GAPDH au niveau des oligonucléotides Smad-SBE, Msx et NF-1. Les oligonucléotides radiomarqués sont incubés ou non avec 50µM de S23906-1 pendant 16h à 37°C. Après une incubation de 30min à 4°C avec la GAPDH pure de poulet ou les extraits protéiques, les ADN libres ou complexes sont séparés sur gel d'acrylamide à 6%.

Nous voyons ensuite que la GAPDH interagit de manière plus importante avec Smad-SBE et Msx alkylés par rapport à NF-1 alkylé. Des gels complémentaires, et notamment un gel réalisé avec l'oligonucléotide Pit-1, ont conforté ces résultats et sont exposés dans le graphique suivant (figure 64).

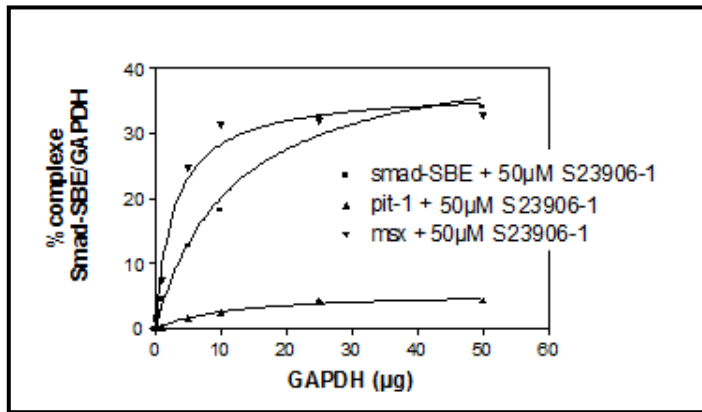


Figure 64: Comparaison de la fixation de la GAPDH entre les oligonucléotides Smad-SBE, Msx et Pit-1 alkylés. Une analyse via le logiciel ImageQuant de chacun des retards en gel montre une fixation importante de la GAPDH à Smad-SBE et Msx alkylés.

Nous n’observons qu’une très faible fixation de la GAPDH pour Pit-1, suggérant encore une certaine sélectivité de séquence reconnue par la GAPDH.

Enfin, nous avons également évalué le taux de recrutement de la GAPDH au niveau des oligonucléotides Smad-SBE mutés alkylés ou non.

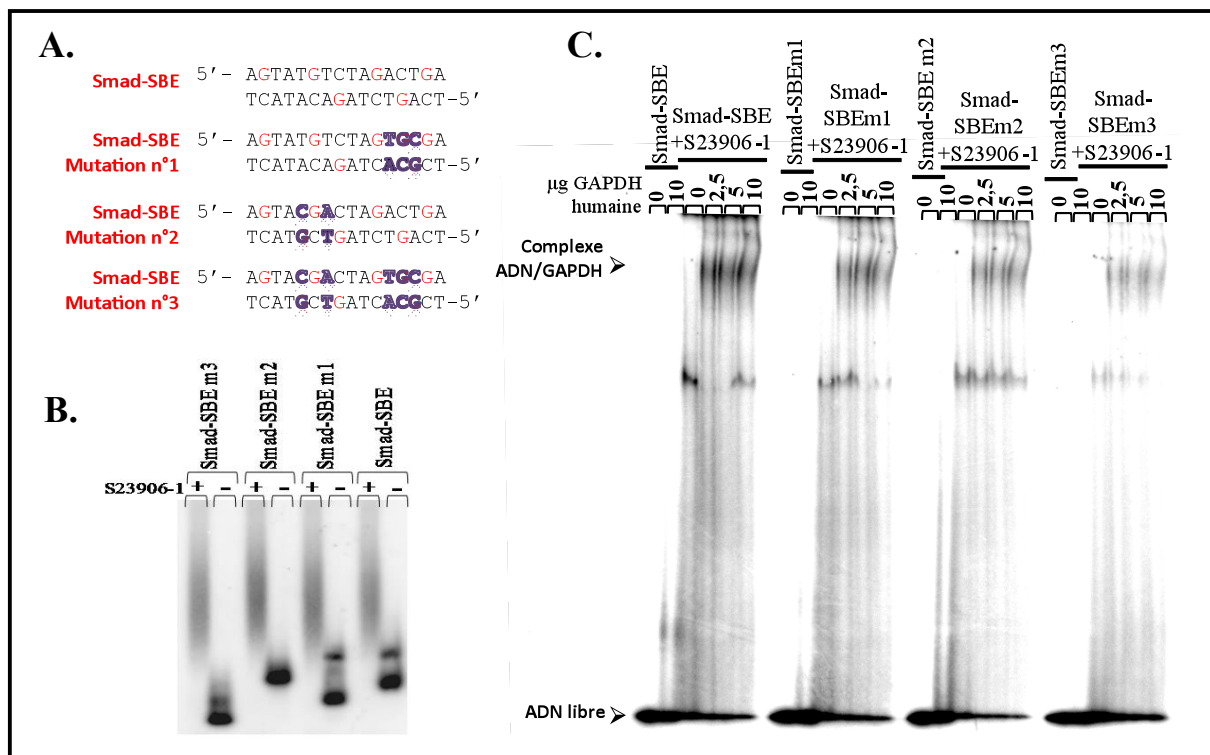


Figure 65: Retards en gel des oligonucléotides Smad-SBE mutés alkylés ou non par le S23906-1, puis incubés avec la GAPDH humaine. (A) Séquence des différentes mutations de Smad-SBE. (B) Smad-SBE mutés ou non sont alkylés ou non avec 50µM de S23906-1 pendant 16H. L’adduit est séparé de l’ADN non alkylé sur un gel d’acrylamide 10% (C) Les oligonucléotides sont ensuite incubés ou non avec la GAPDH d’érythrocyte humaine pendant 30 min à 4°C. Les complexes sont séparés sur un gel d’acrylamide 6%.

Cette expérience montre que plusieurs sites seraient reconnus par la GAPDH au niveau de l’oligonucléotide Smad-SBE alkylé puisque les différentes mutations (ACT→TGC ou TGT→CGA) engendrent une diminution de fixation de la protéine (figure 65).

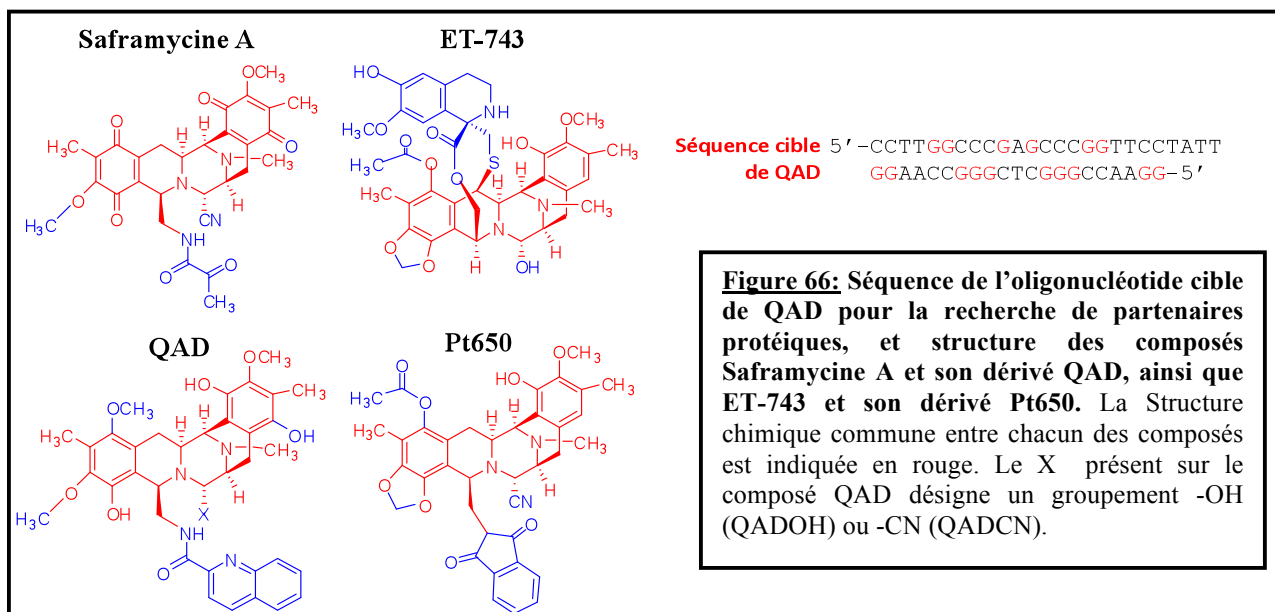
Ainsi la GAPDH se fixe sur une séquence particulière ceci d'autant plus lorsqu'elle est alkylée par le S23906-1. De manière intéressante, la fixation ne dépend pas de la quantité en paires de bases GC présentes au sein de l'oligonucléotide puisque : Smad-SBE en compte une de moins que Pit-1 mais est mieux reconnu par la GAPDH, alors que les oligonucléotides Smad-SBE mutés en compte une ou deux de plus et sont moins bien reconnus. Nous nous sommes donc aussi demandés si la GAPDH ne reconnaîtrait pas l'ADN déstabilisé ou simple brin, en plus de son éventuelle séquence cible sur de l'ADN double brin.

2.3.4. Interaction GAPDH/Smad-SBE alkylé par d'autres composés

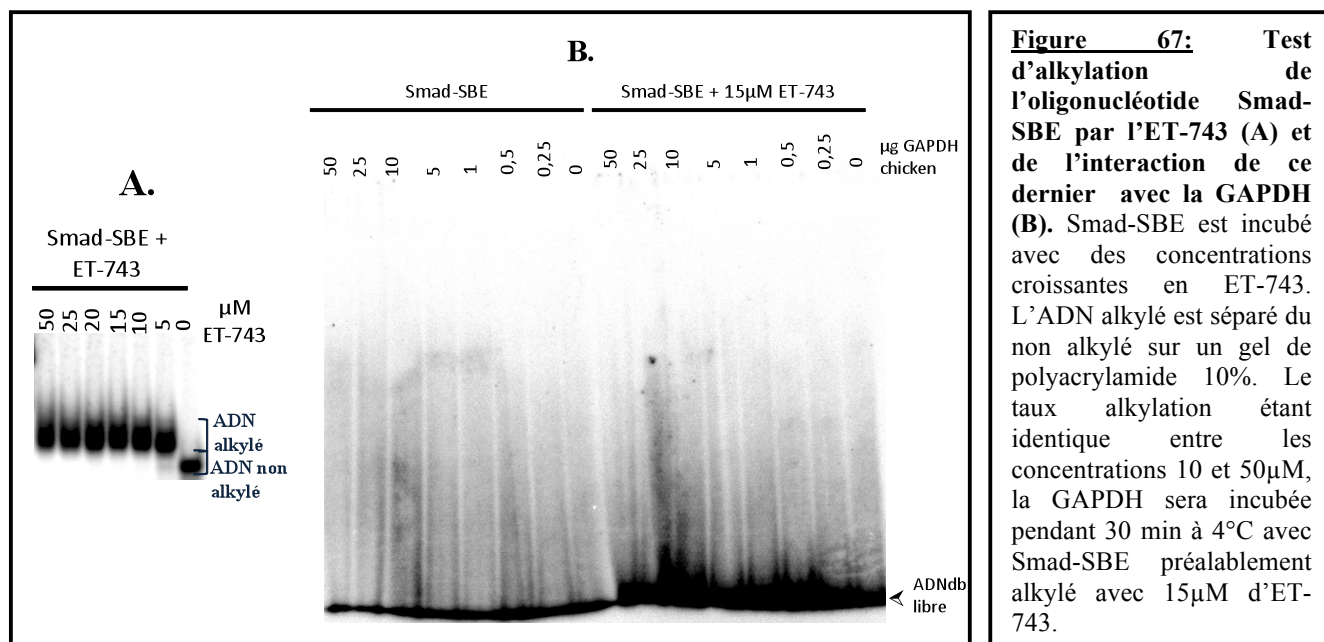
Pour répondre à cette question, nous avons évalué la capacité de fixation de la GAPDH à l'oligonucléotide Smad-SBE alkylé par l'ET-743 (agent alkylant stabilisant l'ADN au niveau du petit sillon), les énantiomères S27589-1 et S27590-1 pour lesquels nous avons montré préalablement un lien entre la déstabilisation de l'ADN et l'activité cytotoxique, ou encore des dérivés du S23906-1.

2.3.4.1. Interaction GAPDH/Smad-SBE alkylé par ET-743

Il est important de rappeler que la GAPDH contenue dans le lysat de cellules A549 interagit également avec l'adduit du composé QAD, un dérivé de la Saframycine A qui est lui-même structurellement très proche de l'ET-743 (*figure 66*) (voir introduction 4.6.5), avec l'ADN présentant les sites de fixation connus des saframycines et ceux du cisplatine, du transplatine et de la mitomycine C (utilisés comme contrôle dans leurs expériences).



Nous ne disposons malheureusement pas des composés QADOH et QADCN, qui nous auraient permis le contrôle du recrutement de la GAPDH sur Smad-SBE alkylé par ces derniers. Cependant, les auteurs de cet article ont également montré le recrutement de la GAPDH à l'adduit ADN/Pt650, un alkylant dérivé de l'ET-743 (figure 66). Après validation par retard en gel de la qualité d'alkylation de Smad-SBE par l'ET-743 (figure 67A), nous avons testé la capacité de fixation de la GAPDH à cet adduit (figure 67B).



Bien que cette séquence soit correctement alkylée par l'ET-743 (figure 67A), ce dernier ne permet pas le recrutement de la GAPDH (figure 67B). Ce phénomène peut être dû au fait que ce composé ne déstabilise pas la double hélice ou alors que l'encombrement stérique et les modifications structurales induites par cette alkylation empêchent toute reconnaissance de l'ADN par la GAPDH.

2.3.4.2. Interaction à Smad-SBE alkylé par des dérivés du S23906-1

Nous avons également testé la capacité de fixation de la GAPDH à Smad-SBE alkylé avec certains dérivés du S23906-1, qui présentent donc une structure plus proche de notre composé mais qui alkylent plus ou moins efficacement l'ADN.

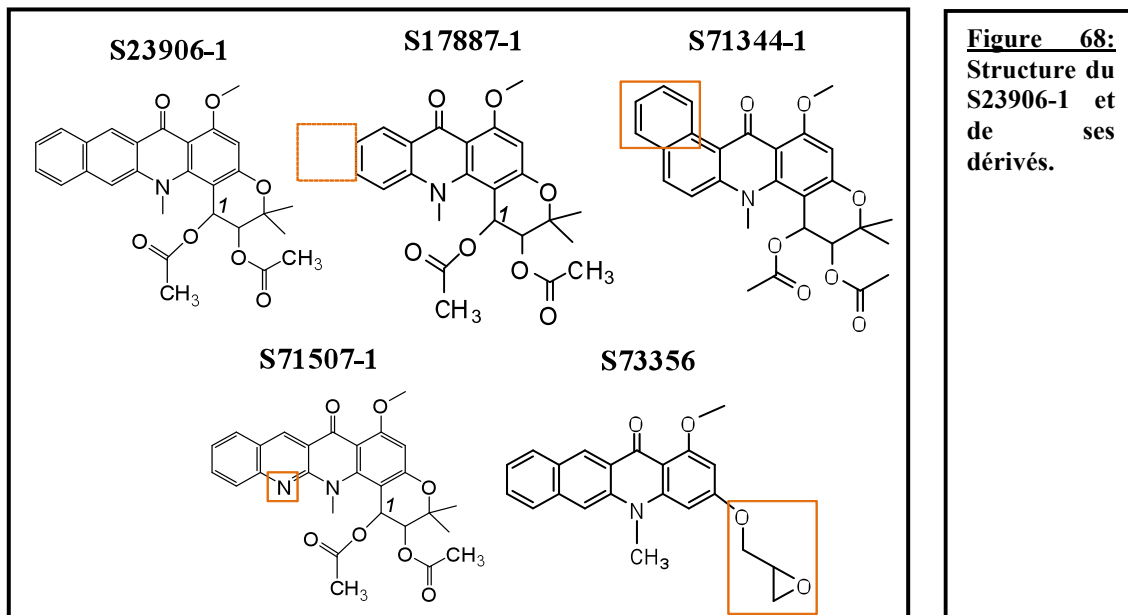


Figure 68: Structure du S23906-1 et de ses dérivés.

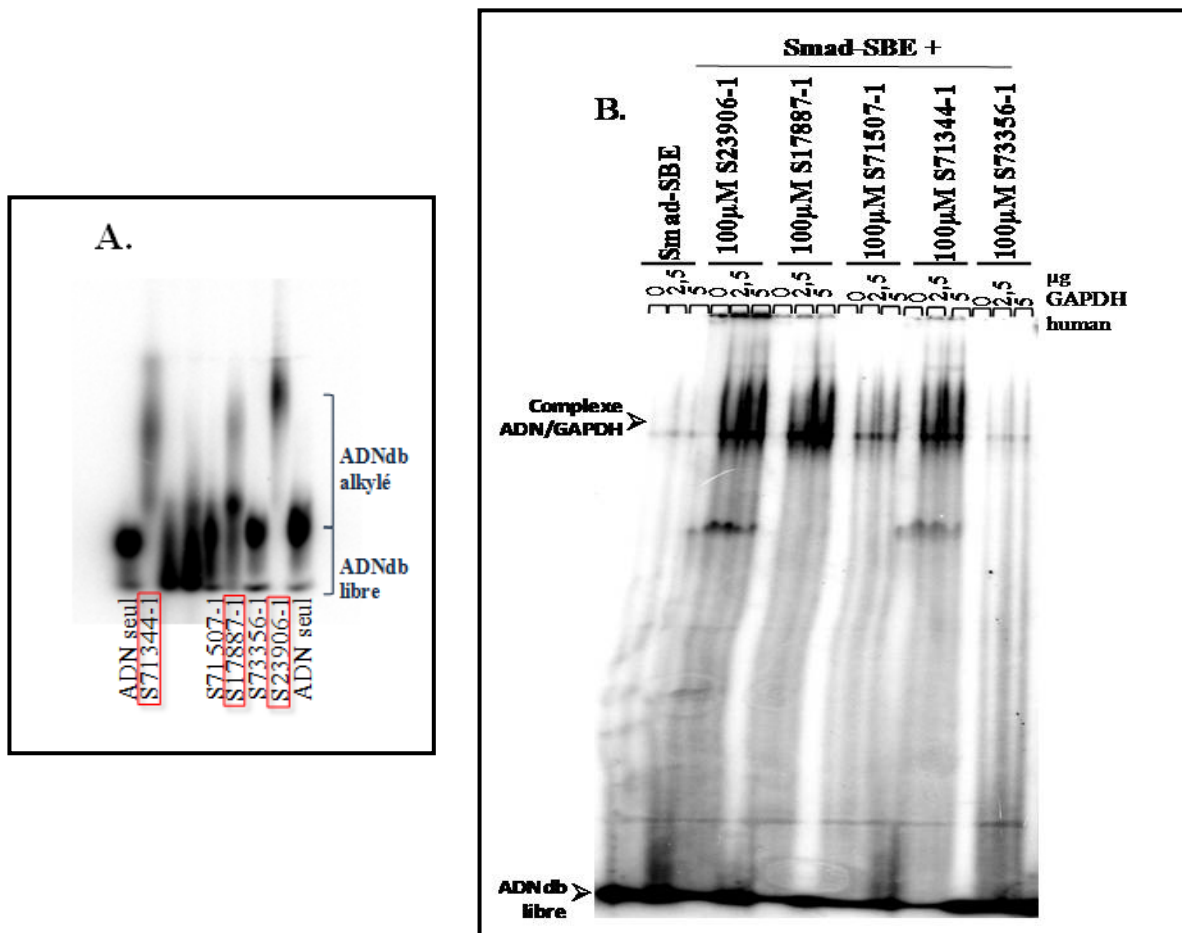


Figure 69: Interaction de la GAPDH au niveau de l'oligonucléotide Smad-SBE alkylé ou non par des dérivés du S23906-1. (A) Retard en gel d'acrylamide à 10% de l'alkylation de chacun des composés (100µM de S23906, S18887, S71507, S71344, S73356, S75162 et S74495) incubés avec Smad-SBE pendant 16H à 37°C. (B) Les oligonucléotides alkylés sont ensuite incubés pendant 30min à 4°C avec différentes quantités de GAPDH humaine.

Nous observons que les adduits formés avec chaque composé di-acétylé sont reconnus par la GAPDH, ainsi qu'une fixation préférentielle de la GAPDH à Smad-SBE alkylé par les composés qui alkylent le mieux (S23906-1, S71344-1 et S17887-1) (*figure 69*). Ce gel montre un lien entre l'intensité d'alkylation de l'oligonucléotide et la fixation de la GAPDH. Le S71344-1 présente en effet une capacité d'alkylation et de déstabilisation identique à celle du S23906-1 et ils présentent tous les deux le même taux de recrutement de GAPDH. La présence d'un atome d'azote supplémentaire sur l'un des cycles benzène ou l'absence du groupement réactif diacétate diminue l'efficacité d'alkylation des composés S71507-1 et S73356-1, nous observons que cela restreint également le recrutement de la GAPDH à Smad-SBE (*figure 69*).

De plus, le S17887-1 permet une fixation importante de GAPDH (*figure 69B*). Il alkyle un peu moins efficacement l'oligonucléotide par rapport au S23906-1, mais induit une déstabilisation plus forte de la double hélice [6]. Le composé S73356-1 interagit quant à lui avec l'azote en position 7 des guanines et ne déstabilise pas l'ADN (d'où un très faible retard de migration (*figure 69A*)). Ce composé n'induit pas de recrutement de la GAPDH à Smad-SBE, suggérant l'importance du site d'alkylation dans le petit sillon et/ou de la déstabilisation de la double hélice.

Cette expérience montre à la fois l'importance d'une alkylation dans le petit sillon, ainsi qu'une déstabilisation de la double hélice pour obtenir un recrutement efficace de la GAPDH.

2.3.4.3. Importance de l'isomérisation du site d'alkylation du S23906-1 pour le recrutement de la GAPDH

Précédemment, nous avons montré que l'orientation du groupement acétate en position C1 du S23906-1 est importante pour l'activité cytotoxique de ce racémate [306], le composé S27589-1 qui présente une capacité d'ouverture plus importante est plus actif *in vitro* et *in vivo* que le composé S27590-1.

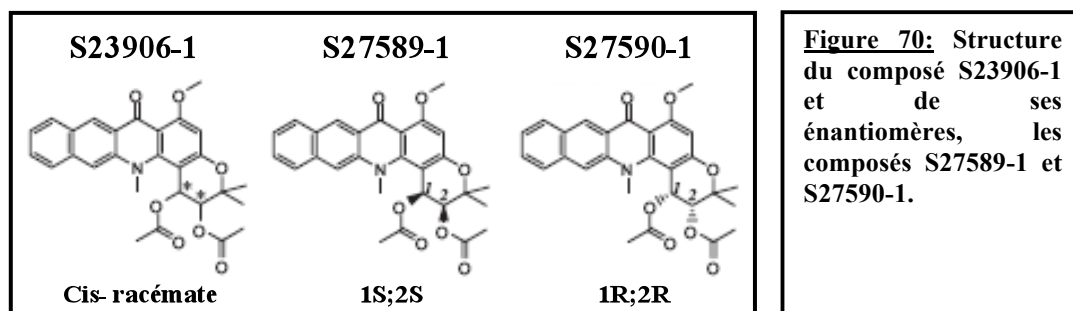
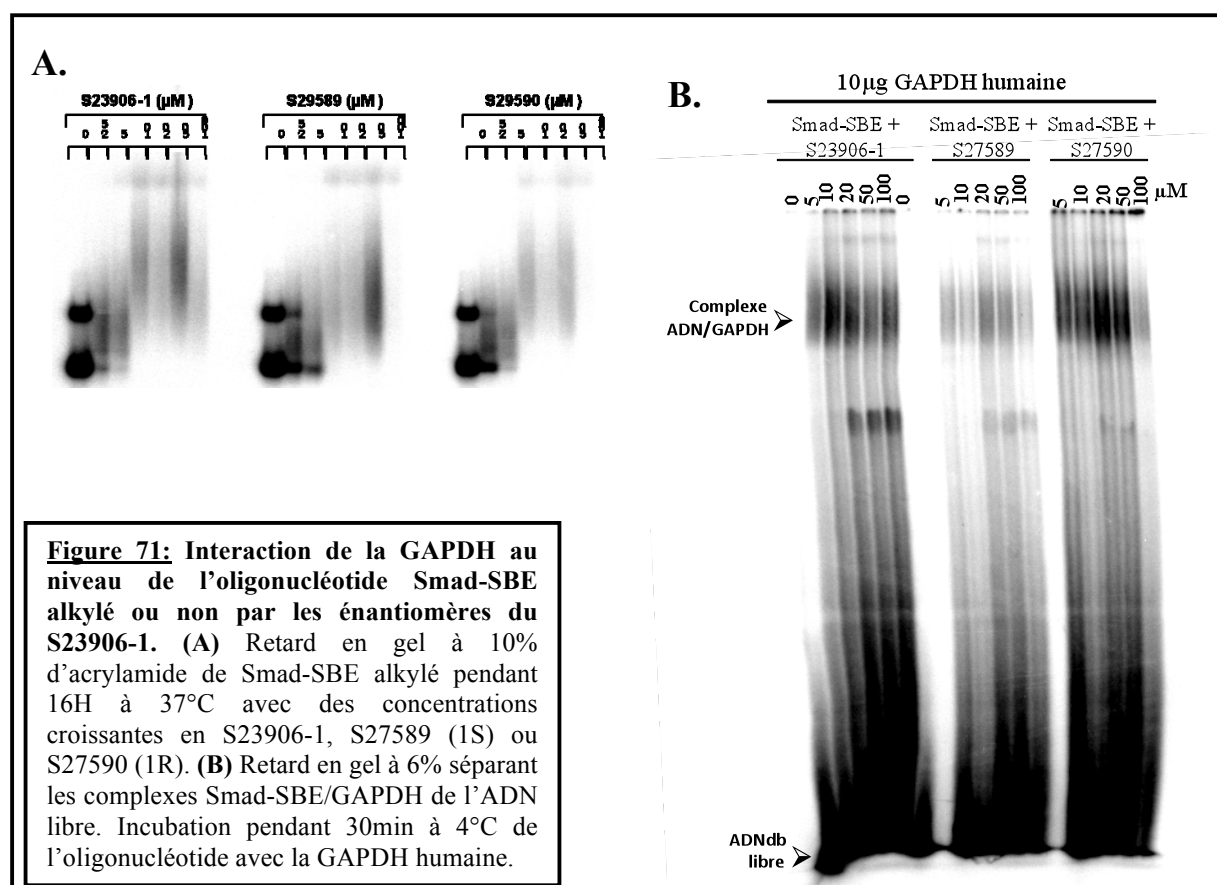


Figure 70: Structure du composé S23906-1 et de ses énantiomères, les composés S27589-1 et S27590-1.

Nous avons testé la capacité de ces deux énantiomères à recruter la GAPDH sur l'oligonucléotide Smad-SBE.



La GAPDH se fixe de manière plus importante à l'oligonucléotide alkylé par le S27590 (composé 1R) par rapport au S27589 (composé 1S) (figure 71). L'isomérisation du composé S23906-1 est également importante pour le recrutement de la GAPDH.

Ainsi, nous avons identifié la GAPDH comme partenaire direct de l'adduit S23906-1/ADN. Cette protéine présente une fixation préférentielle à certaines séquences oligonucléotidiques et son recrutement est également fonction de la nature de l'agent alkylant ainsi que de la modification structurale de l'ADN. Afin de mieux comprendre les conséquences de ce recrutement protéique à la chromatine alkylée par le S23906-1, nous avons recherché s'il existait un site consensus de fixation de la GAPDH à l'ADN.

3. Spécificité de fixation de la GAPDH à l'ADN

3.1. Identification de séquences consensus par CAST-ing

Afin de déterminer cette éventuelle séquence spécifique, nous avons réalisé une sélection par CASTing [307], c'est-à-dire un screening global à partir d'un oligonucléotide aléatoire. Nous avons effectué 6 cycles de sélection/amplification (cf Matériel et Méthodes), puis nous avons cloné dans un vecteur pBS_{II}SK les ampligènes digérés sur les sites de restriction *EcoRI* et *BamHI*. Après amplification en bactérie, 165 clones ont été séquencés. Nous avons ensuite effectué des alignements de séquences à l'aide de différents logiciels en ligne :

- MEME, Multiple Em for Motif Elicitation, version 4.4.0 (http://meme.ncbr.net/meme4_4_0/cgi-bin/meme.cgi)
- GLAM2, Gapped local Alignment of Motifs, version 4.4.0 (http://meme.ncbr.net/meme4_4_0/cgi-bin/glam2.cgi)
- RSA-tools-info-gibbs (http://rsat.ulb.ac.be/rsat/info-gibbs_form.cgi)
- Melina II, Motif Elucidator in Nucleic Acid Assembly, version 1.1 (<http://melina2.hgc.jp/public/index.html>)
- YMF (<http://wingless.cs.washington.edu/YMF/YMFWeb/YMFInput.p1>)
- BioProspector (<http://robotics.stanford.edu/~xsliu/cgi-bin/BPsearch.cgi>)

Chacun de ces logiciels nous a donné un ou plusieurs « consensus » autour d'un « core » riche en paires de bases GT, mais aucun consensus strict. Devant le manque d'homogénéité de ces

méthodes mathématiques, nous avons repris les données et quantifié chaque succession de 2, 3, 4 et 5 paires de bases qui nous ont permis de proposer l’alignement suivant (figure 72).

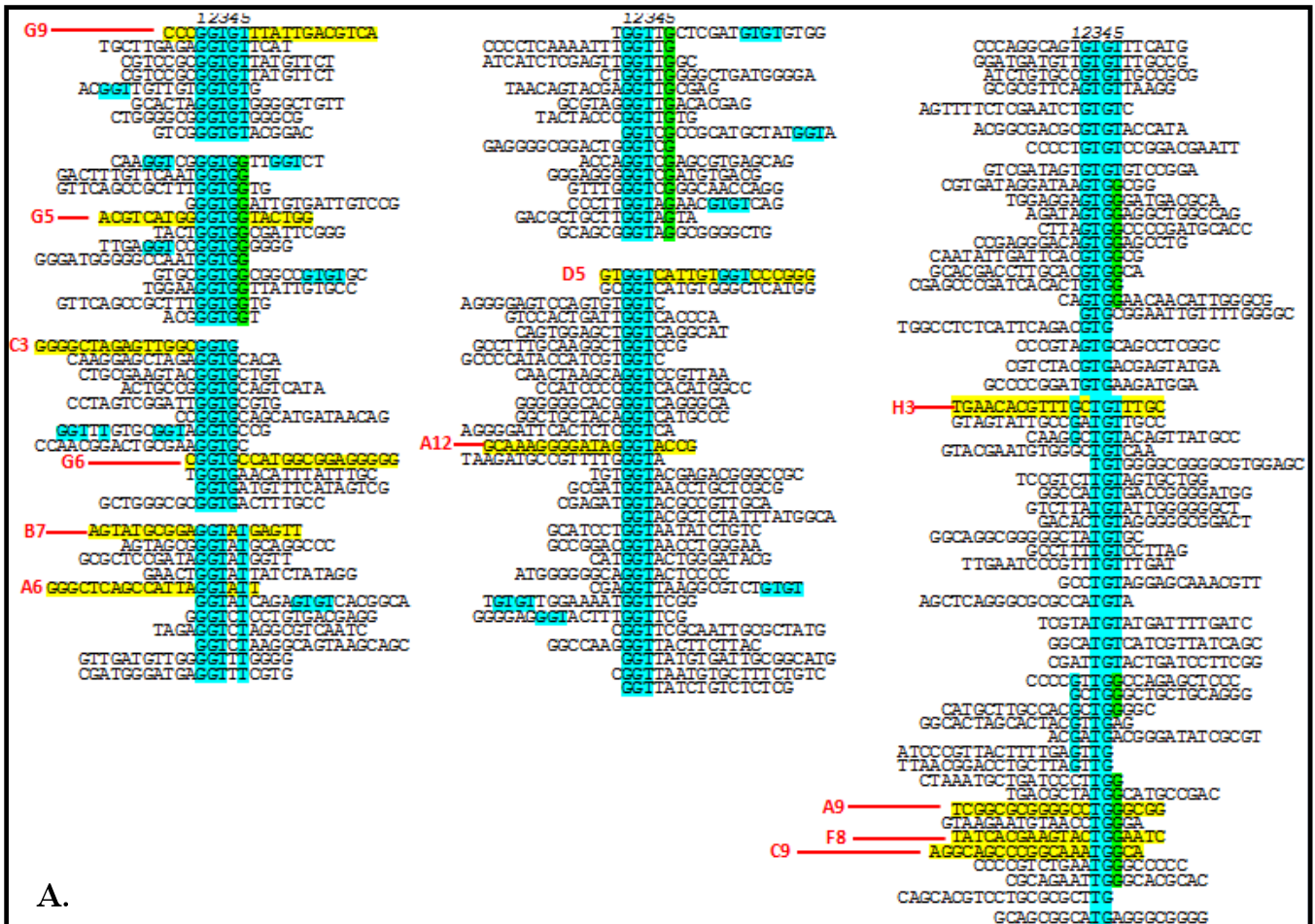


Figure 72: Oligonucléotides interagissant avec la GAPDH.

(A) Les séquences de l’expérience de CASTing, ont été alignées grâce à la quantification de chacune des successions de 2, 3, 4, ou 5 bases. Le consensus obtenu est indiqué en bleu. (B) Le tableau indique le nombre de bases C, G, T ou A obtenues pour chacune des positions (-1 à +6), le consensus final est quant à lui exprimé en pourcentage, par rapport au nombre total de séquences alignées. Les douze oligonucléotides qui ont été retenus pour une validation par retard en gel sont surlignés en jaune et numérotés en rouge.

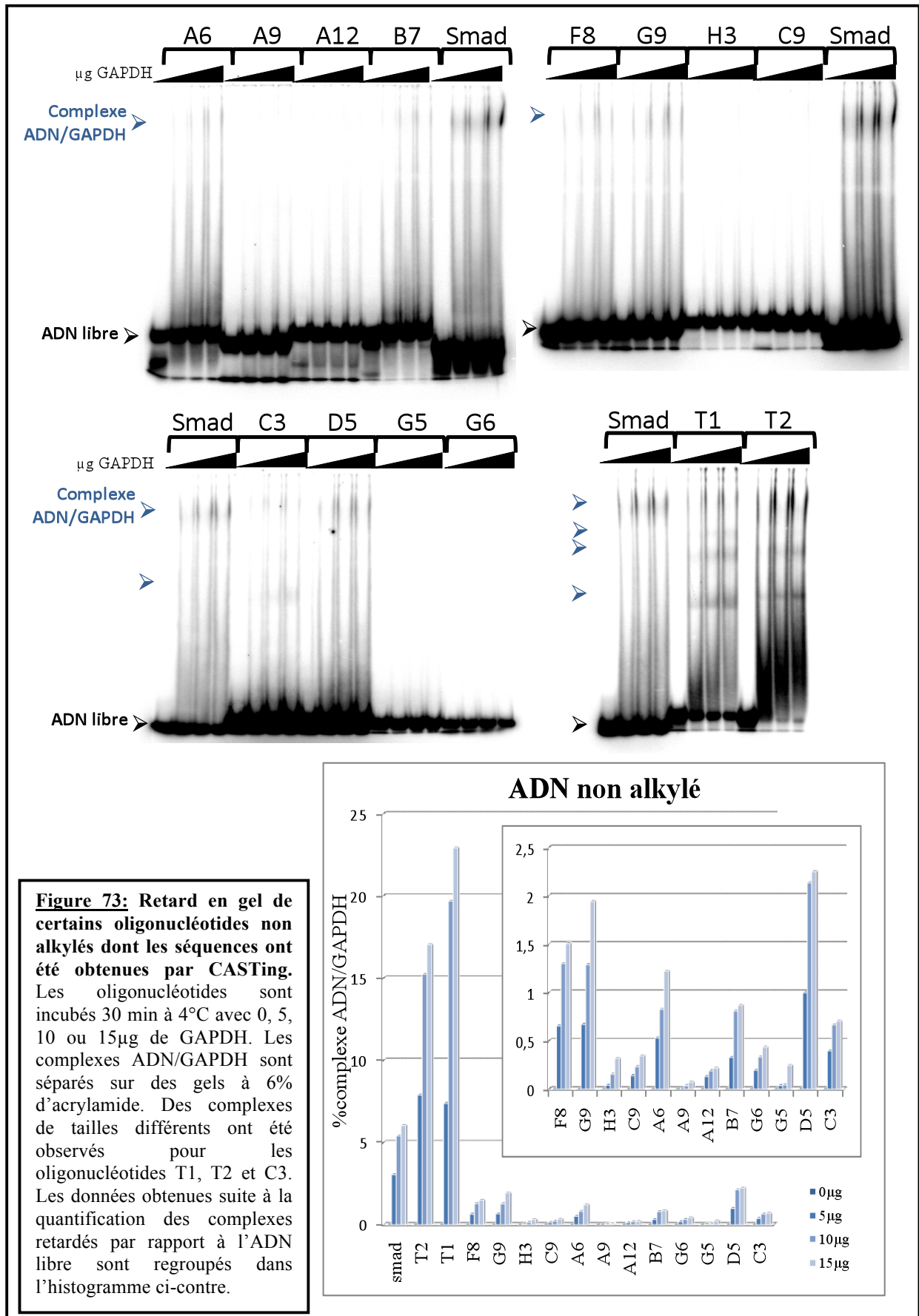
Cet alignement nous a ainsi permis de mettre en évidence un site consensus potentiel de fixation de la GAPDH à l’ADN. Ce consensus GGTgt ou GGTgg paraît en accord avec certaines données de la littérature. En effet, il a été montré que la GAPDH interagit avec l’ADN télomérique au sein de lignées cancéreuses (A549) ou non cancéreuse (MLE-15) [223, 234]. De plus, suite au traitement des cellules A549 avec la doxorubicine (agent intercalent et poison de la topoisomérase II) et la gemcitabine (antimétabolite), la GAPDH empêcherait le raccourcissement des télomères puisque la synthèse d’une GAPDH mutée pour l’Asp³⁴ et la

Cys¹⁵² (sites d'interaction à l'ADN (*figure 58*)) rend les cellules plus sensibles à ces agents cytotoxiques [223]. Des tests avec des oligonucléotides contenant 1 à 3 séquences télomérique répétées (TTAGGG) ont montré que plus le nombre de répétitions augmentait plus la GAPDH se fixait [223]. Des expériences ont également indiqué que la GAPDH se fixe d'avantage sur l'oligonucléotide contenant la séquence télomérique répétée trois fois (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGG-3') quand celle-ci est sous forme simple brin par rapport au double brin. Plus récemment, la même équipe a montré par des tests de compétition avec des séquences (TTAGGG)₃ mutées pour chacune des bases, que la GAPDH reconnaît plus particulièrement les bases GGT (soulignées) de la séquence ggT₁T₂A₃G₄G₅G₆tt, chevauchant donc deux « motifs télomériques ». En effet, l'oligonucléotide 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTT-3' comportant 3 sites GGT fixe plus fortement la GAPDH que la séquence 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGG-3', n'en comportant que 2 (soulignés) [234].

3.2. Validation du consensus par retard en gel, ADN non alkylé

Une validation par retard sur gel a été réalisée en sélectionnant dans un premier temps:

- 12 oligonucléotides doubles brins obtenus par CASTing, qui contiennent des séquences plus ou moins proches de celle du consensus potentiel (*figure 72*)
- la séquence télomérique simple brin 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTT-3' synthétisée par cette équipe (que nous appellerons T2)
- la séquence télomérique « classique » (TTAGGG)₃ pour laquelle nous avons ajouté un AGGG en 5' : 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (que nous appellerons T1). Cette séquence comprend donc 3 sites GGT comme T2.



Les expériences de retard en gel ont été réalisées dans un premier temps avec les séquences non alkylées par le S23906-1 (*figure 73*). Elles nous montrent tout d'abord que les séquences de type télomérique recrutent plus efficacement la GAPDH par rapport à **Smad-SBE**. De plus, et de manière très intéressante, nous observons plusieurs complexes ADN/GAPDH de tailles différentes au niveau des oligonucléotides **T1**, **T2** et **C3**, ces résultats sont corrélés avec les expériences de Demarse et al. qui montraient que la GAPDH pouvait se fixer sous forme de dimères pour un oligonucléotide ou de tétramères pour deux oligonucléotides de 18 bases [234]. Ainsi le complexe le plus retardé en gel correspondrait à la fixation de tétramère, et les bandes intermédiaires à la fixation en monomère ou dimère.

Afin de mieux comprendre le système de reconnaissance de la GAPDH à l'ADN et de valider le consensus observé, nous avons réalisé un classement des séquences oligonucléotidiques en fonction de leur proximité au consensus, puis en fonction de leur capacité à interagir avec la GAPDH ; et nous les avons comparés (*figure 74*).

Nous observons que le classement des oligonucléotides non alkylés en fonction de leur interaction plus ou moins importante à la GAPDH s'aligne en grande partie sur le classement des séquences en fonction de leur identité au consensus. En effet, la GAPDH reconnaît le consensus entier (**GGTGt/g (G9)**) de manière importante par rapport aux séquences obtenues par CASTing qui ne présentent pas de consensus (**C9** et **A9**).

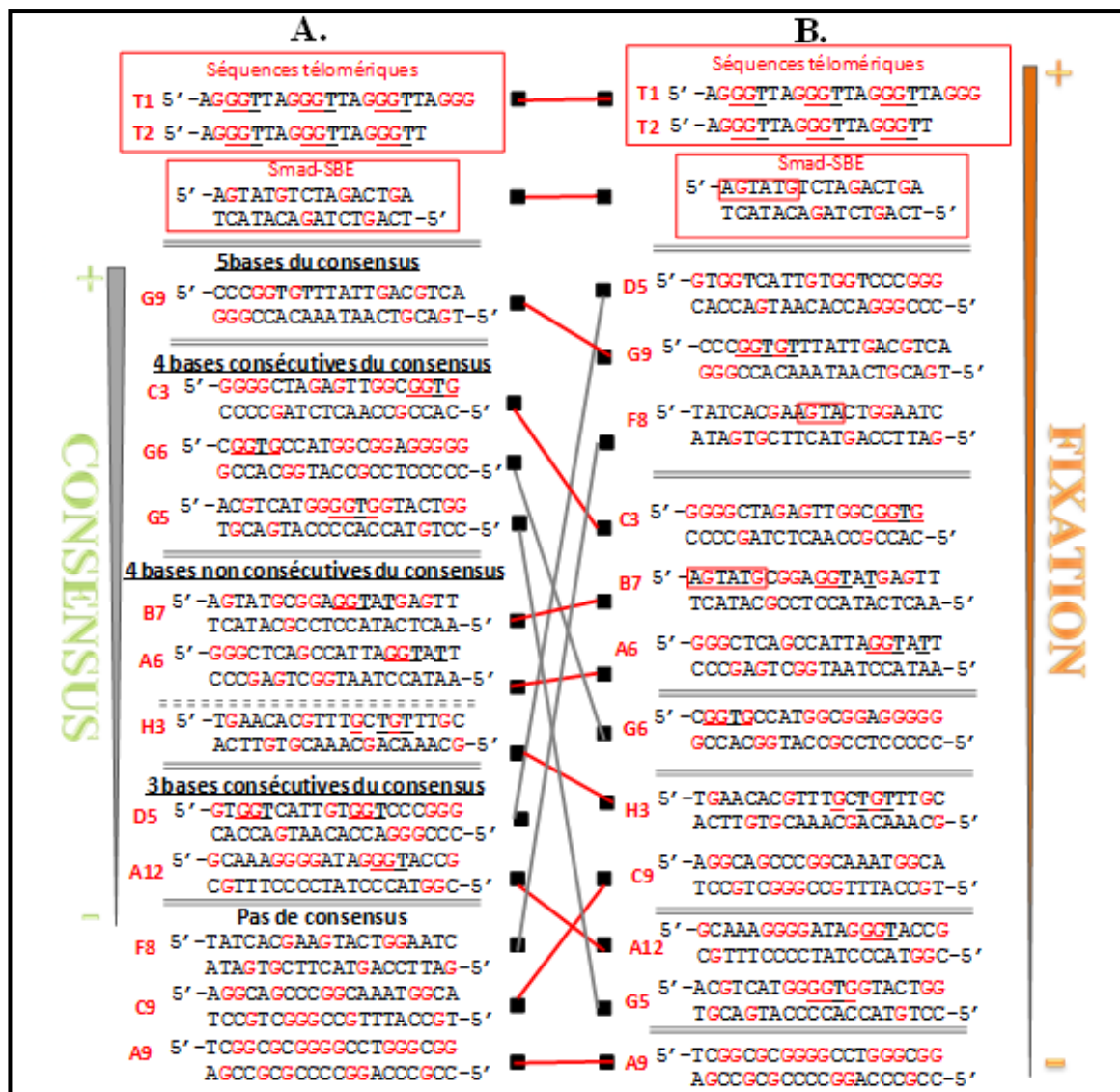


Figure 74: Classements des oligonucléotides interagissant avec la GAPDH (A) en fonction de la présence d'une séquence plus ou moins proche de celle du consensus ou (B) en fonction de la quantification de l'intensité des complexes retardés par rapport à l'ADN libre des expériences de retard en gel.

Les oligonucléotides contenant 4 paires de bases consécutives **GGT_nG** (**C3**, **G6** et **G5**) du consensus interagissent moins bien avec la GAPDH, suggérant que la thymine en extrémité 3' du consensus serait importante pour la fixation de la protéine, notamment pour l'oligonucléotide **G5** dont sa position chute dans le classement (*figure 74*). En effet, les oligonucléotides **A6** et **B7** qui contiennent la séquence **GGT_nT** recrutent la GAPDH de manière plus efficace.

De plus la partie **GGT** du consensus est :

- nécessaire puisque **H3 (GnTGT)** recrute peu de GAPDH
- mais pas suffisante car **A12 (GGTnn)** présente également un taux faible de recrutement de la GAPDH
- importante lorsqu'elle est présente en plusieurs exemplaires car elle favorise le recrutement de la GAPDH (**D5, T1, T2**).

Après comparaison des séquences obtenues par CASTing et de la séquence de **Smad-SBE**, nous n'observons pas ce trinucleotide **GGT**. La séquence **AGTA** observée dans Smad-SBE permettrait peut-être le recrutement de la GAPDH, puisque **F8**, qui présente pourtant un consensus faible (**GGTnn**), interagit de manière importante avec la GAPDH. De plus, cette séquence est également retrouvée dans l'oligonucleotide **B7**. Des expériences d'empreintes à la DNase I ont été réalisées avec Smad-SBE incubé avec la GAPDH, cependant la GAPDH n'est pas assez affine pour permettre la détection de son site d'interaction exact à l'ADN. Cette expérience ne peut pas être reproduite avec de l'ADN alkylé par le S23906-1 puisque ce dernier perturbe la migration de l'ADN en gel dénaturant [14].

Enfin, la présence de complexe [ADN/protéine] de différentes tailles au niveau des séquences de type télomérique s'expliquerait par la présence de séquences répétées **GGT**. La fixation de GAPDH se ferait sous forme de dimère ou de tétramère [234]. L'oligonucleotide C3 présente quant à lui deux séquences **GGT** répétées inversées (*figure 74*).

Pour résumer, le consensus observé par CASTing serait un consensus potentiel de recrutement de la GAPDH. Cependant par rapport aux résultats obtenus avec G5 il serait intéressant d'identifier les séquences environnantes qui seraient également importantes à une fixation efficace de la GAPDH. Nous avons obtenu une multitude d'autres oligonucleotides, il faudra tester leur interaction avec la GAPDH afin de valider sa sélectivité de séquence. De plus ces résultats montrent de nouveau que la GAPDH présente des sites préférentiels de fixation et qu'elle fixerait d'avantage les télomères.

3.3. Validation du consensus par retard en gel, ADN alkylé par le S23906-1

Nos expériences ont montré que la GAPDH se fixait de manière préférentielle à Smad-SBE alkylé par rapport au non alkylé. Nous avons donc évalué le taux de recrutement de la GAPDH aux différentes séquences testées précédemment mais alkylées par le S23906-1.

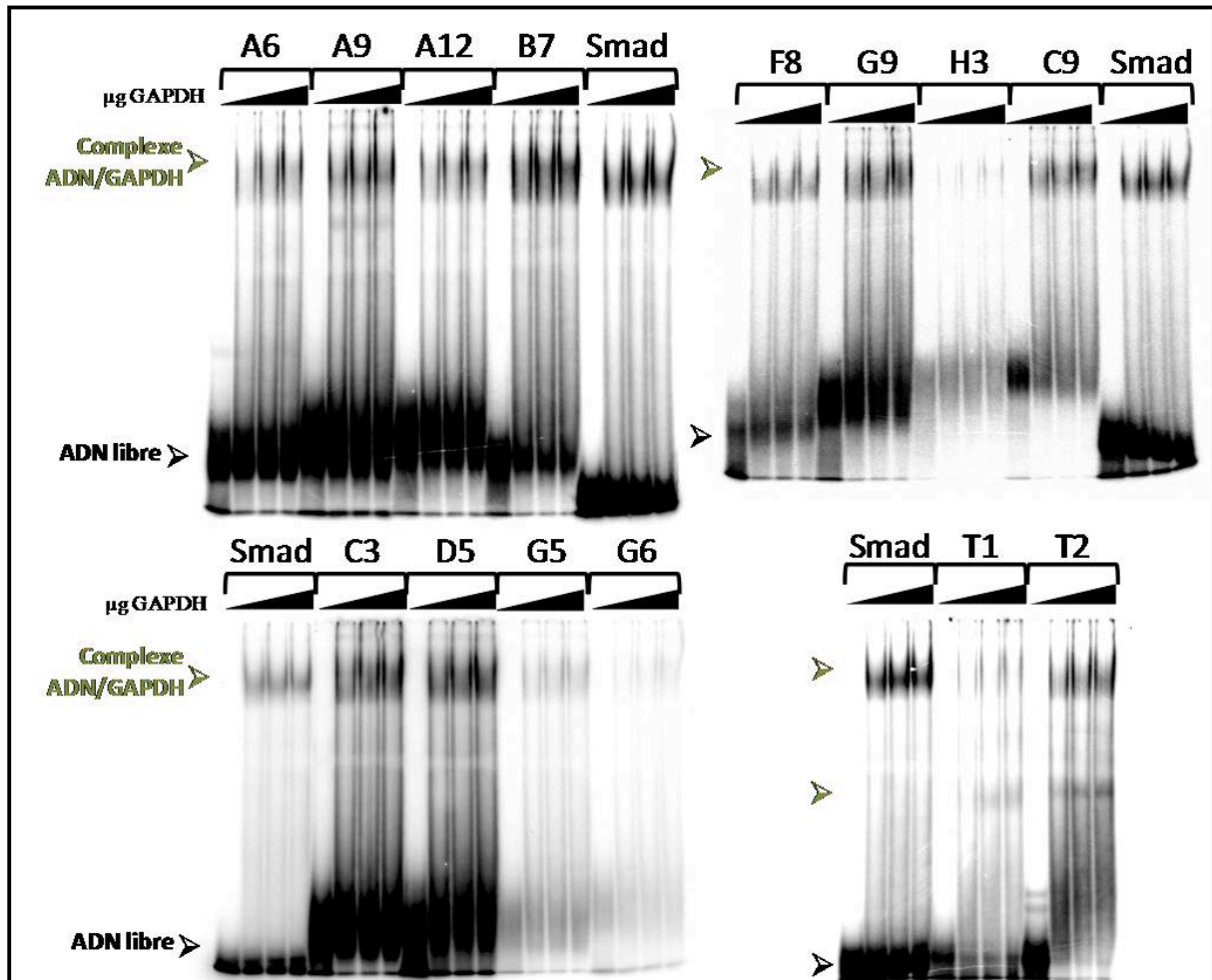
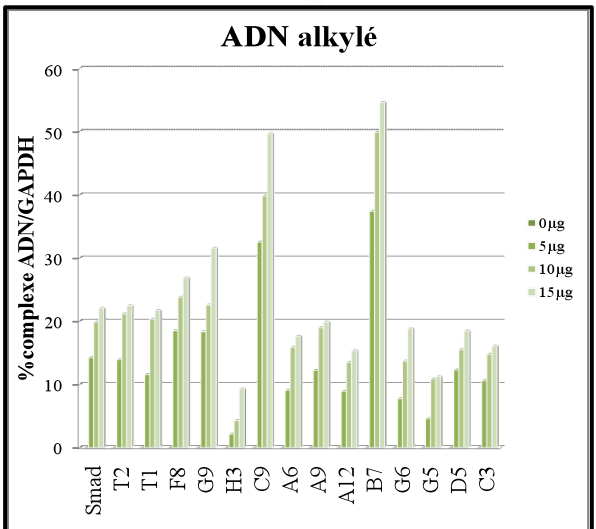


Figure 75: Retard en gel de certains oligonucléotides alkylés dont les séquences ont été obtenues par CASTing. Les oligonucléotides sont incubés 30 min à 4°C avec 0, 5, 10 ou 15µg de GAPDH. Les complexes ADN/GAPDH sont séparés sur des gels à 6% d'acrylamide. Des complexes de tailles différentes ont été observés pour les oligonucléotides T1 et T2. Les données obtenues suite à la quantification des complexes retardés par rapport à l'ADN libre sont regroupées dans l'histogramme ci-contre.



L'efficacité d'alkylation de ces différents oligonucléotides a été validée par migration des ADN alkylés versus non alkylés sur gel de polyacrylamide natif à 10%.

De manière très intéressante, les oligonucléotides **B7**, **C9**, **G9** et **F8** interagissent beaucoup mieux avec la GAPDH, et même mieux que les séquences télomériques ou Smad-SBE alkylées. De plus, l'écart entre le taux de fixation de la GAPDH aux oligonucléotides **B7**, **C9**, **G9** et **F8 non alkylé** et **alkylé** est beaucoup plus important que celui observé pour Smad-SBE (*figure 75*).

Nous observons plusieurs complexes [ADN alkylé/GAPDH] de tailles différentes au niveau des oligonucléotides **T1**, **T2 alkylés** mais en moins grande proportion des bandes plus basses, et plus aucunes bandes les plus basses pour la séquence **C3 alkylée** par rapport aux oligonucléotides non alkylés. Nous observons également que les séquences télomériques (**T1** et **T2**) et **Smad-SBE alkylés** recrutent la GAPDH à un même niveau d'intensité avec 20% d'ADN lié à la GAPDH (*figure 75*).

Les séquences télomériques alkylées ou non fixent de la même manière la GAPDH, suggérant que le S23906-1 ne modifie pas l'affinité de cette séquence à la GAPDH. Mise à part ces deux séquences, tous les oligonucléotides recrutent plus de GAPDH lorsqu'ils sont alkylés (*figure 76A*).

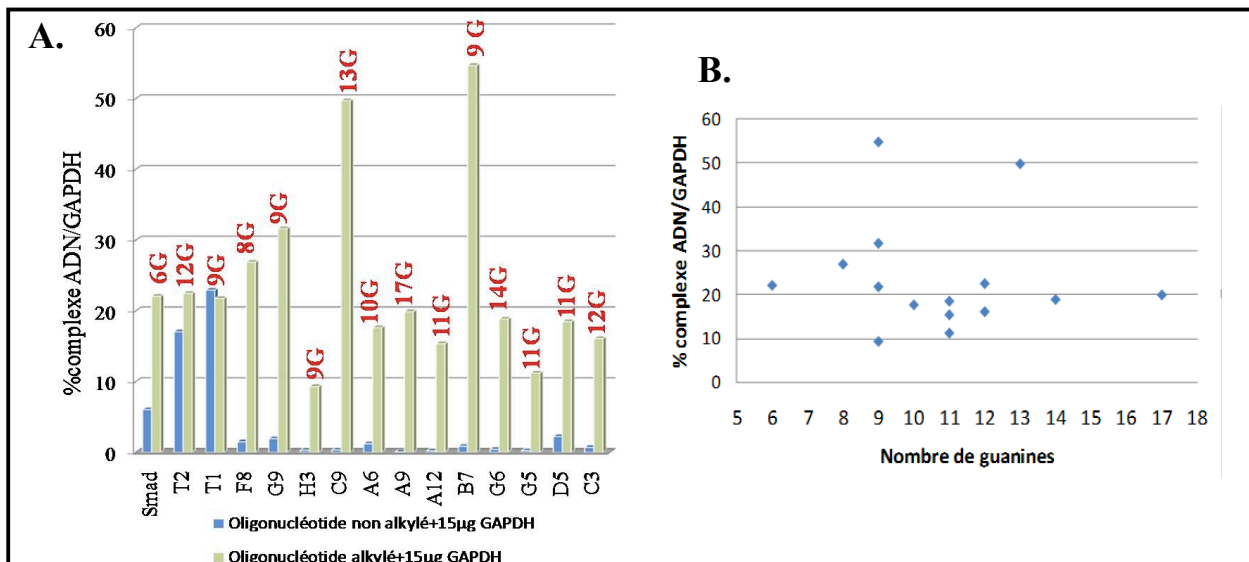


Figure 76: (A) Comparaison du taux de fixation de 15µg de GAPDH entre les oligonucléotides alkylés et non alkylés. Le nombre de guanines par séquence est annoté en rouge. (B) Corrélation du taux de fixation de la GAPDH avec le nombre de guanines par oligonucléotide.

Cependant, la quantité de guanines (cibles du S23906-1) au sein de l'oligonucléotide ne va pas influencer la fixation de la GAPDH (*figure 76B*).

Pour résumer cette partie moléculaire, nous avons observé et confirmé que la GAPDH se fixait majoritairement sur l'ADN télomérique en absence de S23906-1. Par contre, la présence de S23906-1 favorise le recrutement de la GAPDH sur d'autres séquences de l'ADN.

3.4. Stœchiométrie et domaine d'interaction de la GAPDH à l'ADN

Nos expériences de retard en gel ont montré que la GAPDH interagissait préférentiellement avec Smad-SBE simple brin alkylé par rapport au double brin alkylé. Il est alors possible que ce soit deux isoformes différentes qui interagissent avec l'ADNs_b ou db. Comme indiqué dans l'introduction (voir partie 4.6.3), les isoformes contenues dans un pool de GAPDH pure commercial n'interagissent pas de la même manière avec l'ADN : un type interagirait avec du simple brin et l'autre avec du double brin, elles auront alors des fonctions différentes [245].

Il faut noter que la GAPDH est dans la majorité des cas retrouvée sous forme tétramérique au sein de la cellule, lui permettant ainsi d'exercer son activité glycolytique. Si l'on se réfère à l'article de Sirover [127], la présence d'ATP déstabilise ce tétramère. Nous avons alors réalisé un retard en gel en incubant la GAPDH purifiée humaine ou d'extraits nucléaires de cellules HT-29 avec de l'ATP préalablement à l'incubation avec l'ADN radiomarqué (figure 77).

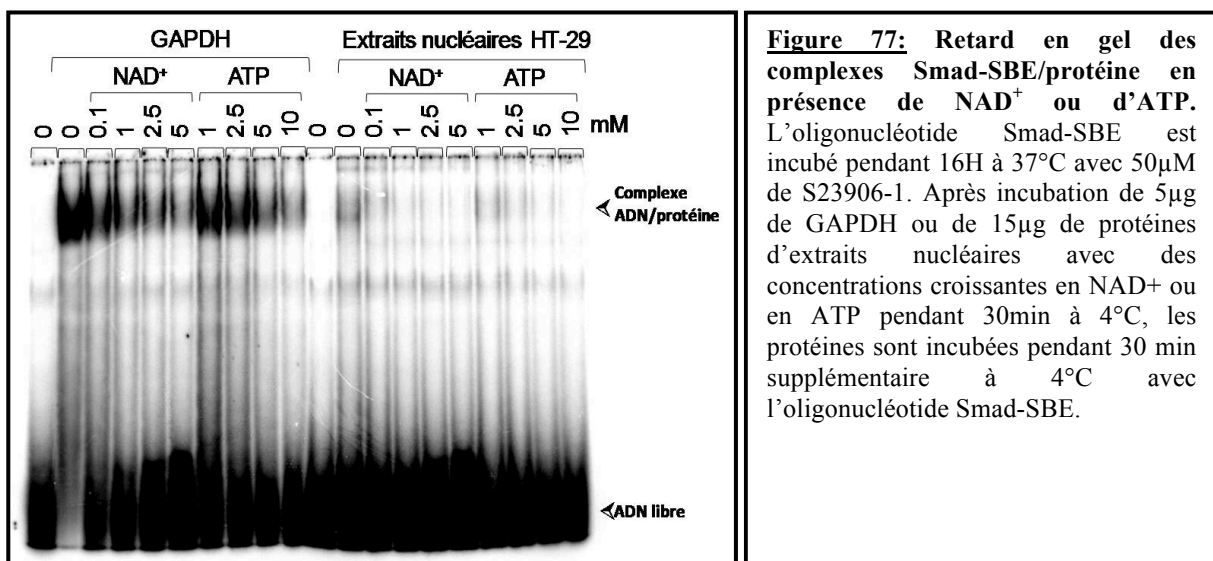


Figure 77: Retard en gel des complexes Smad-SBE/protéine en présence de NAD⁺ ou d'ATP. L'oligonucléotide Smad-SBE est incubé pendant 16h à 37°C avec 50µM de S23906-1. Après incubation de 5µg de GAPDH ou de 15µg de protéines d'extraits nucléaires avec des concentrations croissantes en NAD⁺ ou en ATP pendant 30min à 4°C, les protéines sont incubées pendant 30 min supplémentaire à 4°C avec l'oligonucléotide Smad-SBE.

Sur ce gel, on remarque la parfaite co-migration du complexe GAPDH purifiée/ADN avec celui obtenu avec les extraits nucléaires de cellules HT-29, montrant qu'il s'agirait bien de la GAPDH.

Le complexe [GAPDH/Smad-SBE alkylé] se forme peu en présence de concentrations croissantes en ATP suggérant que la GAPDH (pure ou d'extrait nucléaire de cellules HT-29) interagirait avec Smad-SBE sous forme de tétramère.

De la même manière, nous avons réalisé cette expérience avec les séquences de type télomérique utilisées dans l'expérience de CASTing et pour lesquelles nous avons remarqué la formation de complexes ADN/GAPDH de différentes tailles (figure 78).

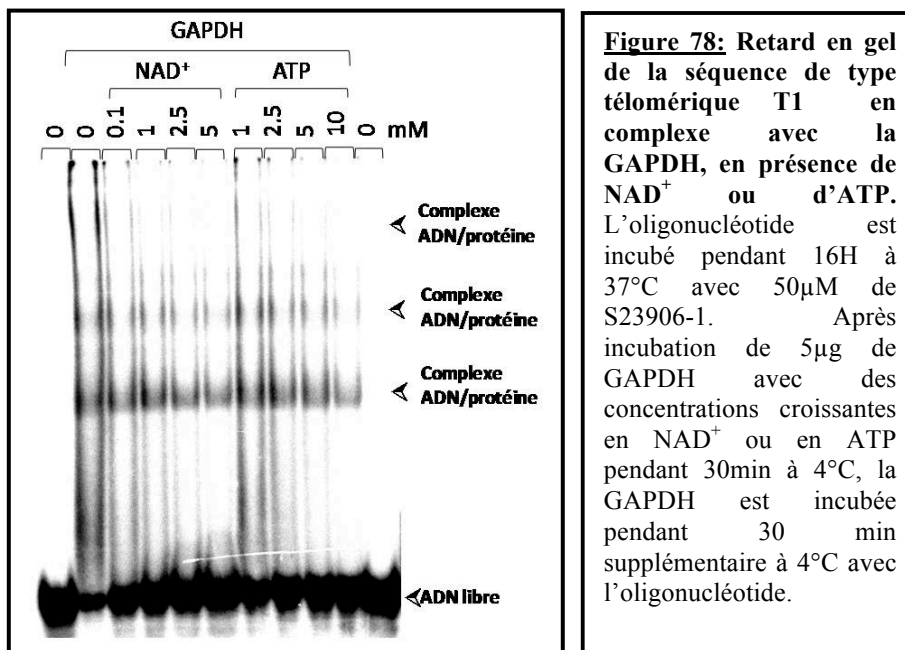


Figure 78: Retard en gel de la séquence de type télomérique T1 en complexe avec la GAPDH, en présence de NAD⁺ ou d'ATP. L'oligonucléotide est incubé pendant 16h à 37°C avec 50µM de S23906-1. Après incubation de 5µg de GAPDH avec des concentrations croissantes en NAD⁺ ou en ATP pendant 30min à 4°C, la GAPDH est incubée pendant 30 min supplémentaire à 4°C avec l'oligonucléotide.

En effet, le complexe ADN/protéine le plus haut est déstabilisé suggérant ainsi que la forme tétramérique de la GAPDH interagit également avec cet ADNs.

Enfin, des études ont montré que la GAPDH de foie humain interagissait avec l'ADN télomérique via son site de liaison au NAD⁺ et que la présence de 2mM de NAD⁺ empêche l'interaction de la GAPDH à l'ADN [223]. De la même manière, nous avons pré-incubé la GAPDH pure d'érythrocytes humains avec des concentrations croissantes en NAD⁺ puis testé son interaction avec Smad-SBE alkylé par le S23906-1 (figure 77). Une diminution progressive de fixation de la GAPDH à l'oligonucléotide est observée suggérant que la GAPDH interagirait avec Smad-SBE via son site NAD⁺. En parallèle, nous avons réalisé d'autres expériences qui ont également mis en évidence la possible interaction de la GAPDH à Smad-SBE alkylé via son site de liaison au G3P (données non montrées).

4. Translocation nucléaire de la GAPDH après traitement au S23906-1

De nombreuses études dans certaines lignées cellulaires ont montré que, suite à certains traitements comme le GSNO (Glutathion nitrosylé), l'étoposide, la staurosporine et la déplétion en sérum, la GAPDH pouvait être transloquée du cytoplasme vers le noyau. C'est le cas également avec le QADOH (dérivé de la Saframycine A) pour lequel Xing et al. ont observé par microscopie confocale une translocation nucléaire de la GAPDH après 48H de traitement des cellules HeLa-S3 [221].

4.1. Etude de la localisation cellulaire de la GAPDH exogène après traitement au S23906-1

Dreyer et al. [142] ont construit un plasmide exprimant une protéine de fusion fluorescente GAPDH-GFP qui présente la même localisation subcellulaire que la GAPDH endogène au niveau de cellules PC12 (cellules différenciées de neurone). Cette protéine chimérique est transloquée dans le noyau après un traitement avec H₂O₂ dans les cellules PC12 [142], mais aussi après traitement à la staurosporine de cellules fibroblastiques R6 [213]. Nous avons obtenu ce vecteur pour effectuer nos expériences.

4.1.1. Mise au point de la transfection dans les cellules A549

Nous avons tout d'abord vérifié le taux de transfection de 500.000 cellules A549 avec 2, 10 ou 20 µg de plasmide (voir la partie Matériel et Méthodes). Après 24H et 48H, les cellules sont récupérées et analysées au cytomètre. 40% des cellules incubées 24H avec 2, 10 ou 20µg de plasmide expriment la GAPDH-GFP. Après 48H, 50% des cellules transfectées avec 2 ou 10µg sont fluorescentes et 60% des cellules transfectées avec 20µg expriment la GAPDH-GFP. Nous avons donc choisi d'introduire 20µg de plasmide pour 500.000 cellules et de regarder l'effet entre 24 et 48H.

De plus, il a été montré que la GAPDH-GFP est localisée majoritairement dans le noyau à hauteur de 75% pour les cellules NB41A3 (cellules dérivées du système nerveux central) alors que la GAPDH endogène est équitablement répartie entre cytoplasme et noyau.

Cette proportion est de 70% pour les cellules fibroblastiques R6 alors qu'il n'y a que 20% de GAPDH endogène nucléaire [213]. Il est donc important de vérifier si la GAPDH-GFP n'est pas transloquée dans le noyau de nos cellules sans traitement préalable au S23906-1. Des photographies ont donc été prises après 30H d'incubation post-transfection à l'étuve (24H d'expression de la GAPDH-GFP + 6H de traitement au S23906-1) (figure 79).

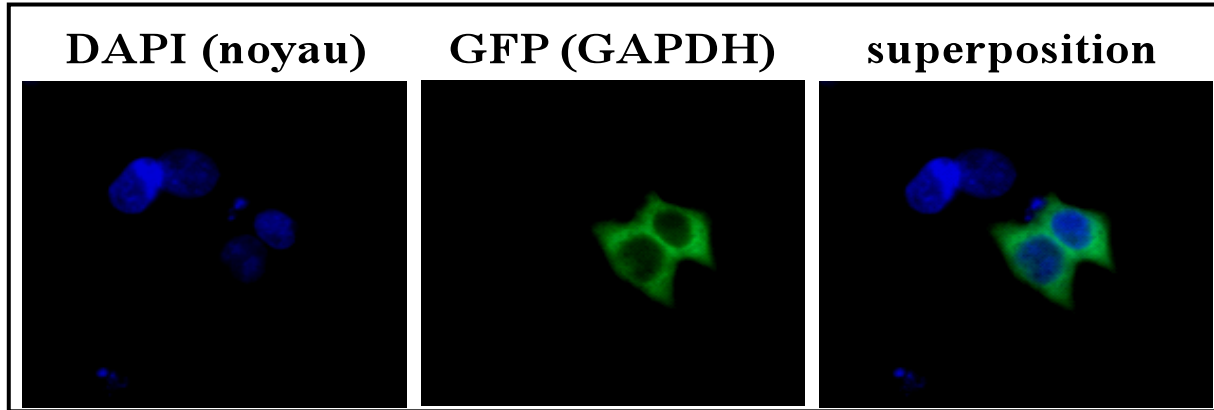


Figure 79: Localisation cellulaire de la GAPDH-GFP 30H post-transfection, sans traitement au S23906-1. 60.000 cellules A549 sont transfectées avec 2,5µg de plasmide puis incubées 30H à l'étuve. Les cellules sont ensuite fixées et observées au microscope à fluorescence.

Nous observons que la GAPDH est localisée exclusivement dans le cytoplasme des cellules A549.

4.1.2. Localisation cellulaire de la GAPDH-GFP : Time Lapse

Nous avons ensuite utilisé la technologie de fluorescence en temps réel (Time lapse) pour visualiser la mobilité intracellulaire de cette protéine fluorescente. Après 24H de transfection, les cellules sont traitées avec 1,5µM de S23906-1 dans une boîte de pétri placée dans l'enclos entourant le microscope à une température de 37°C pendant 6H (figure 80).

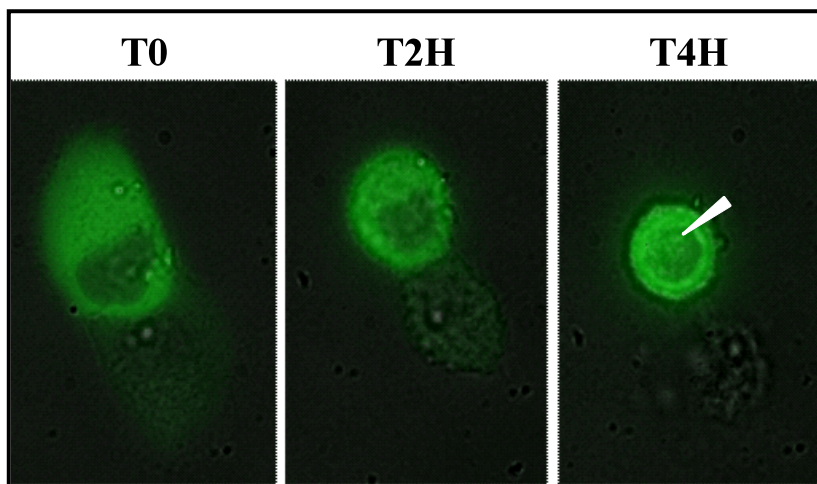


Figure 80: Localisation cellulaire de la GAPDH-GFP après traitement au S23906-1. 60.000 cellules A549 transfectées avec 2,5µg de plasmide GAPDH-GFP sont incubées 24H à l'étuve. Les cellules sont ensuite placées dans l'enceinte du Time Lapse où elles seront traitées avec 1,5µM de S23906-1 dans 500µL de milieu. Une photographie est prise toutes les 30 secondes pendant 6H.

Une augmentation de la fluorescence GFP est observée dans les cellules A549 après traitement avec le S23906-1, correspondant à une translocation nucléaire de la GAPDH exogène. Cependant, puisque la cellule se rétracte il est difficile de différencier une translocation nucléaire d'un recouvrement du noyau par le cytoplasme avec ce type de microscope. Ces résultats sont donc à confirmer en utilisant d'autres techniques de biologie cellulaire et moléculaire.

Il faut noter que les cellules NB41A3 n'entrent pas en apoptose, malgré la forte concentration nucléaire de GAPDH exogène sans traitement avec quelconque pro-apoptotique. L'équipe de chercheurs a d'ailleurs émis l'hypothèse que la seule translocation de la GAPDH n'induisait pas la mort des cellules [213]. D'ailleurs, puisque nous avons vu plus haut que la GAPDH interagissait avec l'ADN des cellules, il est possible que cette protéine chimérique puisse être transloquée dans le noyau mais ne puisse pas interagir avec ses cibles nucléotidiques. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse.

4.1.3. Etude de l'interaction entre la GAPDH chimérique et Smad-SBE

Nous avons récupéré la séquence d'ADNc de cette protéine qui se trouve dans le plasmide qui nous a été donné (plasmides contenant soit la GAPDH-GFP soit la GAPDH-BFP), puis nous l'avons introduite dans le vecteur d'expression pBS_{IT}KS (voir le Matériel et Méthodes). Cette expérience a été validée par des tests de coupure enzymatique sur l'ADNc contenu dans le vecteur puis par séquençage de l'insert. L'expression a ensuite été validée par synthèse protéique en lysat de réticulocytes, en présence de méthionine marquée au [³⁵S] (*figure 81A*). Enfin, la protéine a été produite en lysat de réticulocytes en absence de radioactivité pour l'expérience de retard en gel (*figure 81B*).

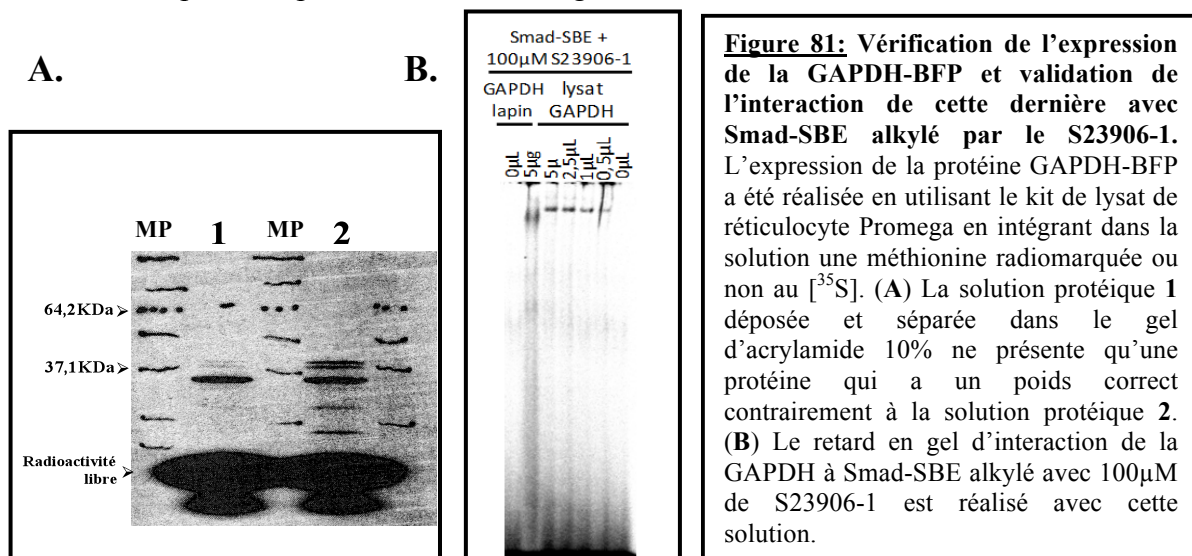


Figure 81: Vérification de l'expression de la GAPDH-BFP et validation de l'interaction de cette dernière avec Smad-SBE alkylé par le S23906-1. L'expression de la protéine GAPDH-BFP a été réalisée en utilisant le kit de lysat de réticulocyte Promega en intégrant dans la solution une méthionine radiomarquée ou non au [³⁵S]. (A) La solution protéique 1 déposée et séparée dans le gel d'acrylamide 10% ne présente qu'une protéine qui a un poids correct contrairement à la solution protéique 2. (B) Le retard en gel d'interaction de la GAPDH à Smad-SBE alkylé avec 100µM de S23906-1 est réalisé avec cette solution.

Même si l'expérience d'interaction avec Smad-SBE a été réalisée avec la GAPDH-BFP, la présence de la protéine fluorescente ne générerait pas la fixation de la GAPDH à sa cible oligonucléotidique. L'expression de la GAPDH-GFP apparaîtrait donc comme une surexpression de la GAPDH au sein des cellules.

4.1.4. Conséquences de la surexpression globale de la GAPDH

Après traitement avec 200 nM de staurosporine (concentration qui induit peu d'apoptose), une translocation nucléaire plus importante de GAPDH endogène (65% contre 50% sans traitement pour NB41A3 et 55-65% contre 20% pour les R6) est observée par rapport à la translocation générée avec 100µM de H₂O₂ (concentration qui n'induit pas l'apoptose). Une surexpression de la GAPDH de l'ordre de 50% a également été montrée dans les cellules non-apoptotiques et de 300% dans les cellules apoptotiques [213].

Puisque l'expression de la GAPDH-GFP induit une augmentation d'expression globale de la GAPDH, nous avons transfecté les cellules A549 pendant 24H en présence du plasmide vide ou du vecteur exprimant la GAPDH-GFP. Le taux de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été mesuré après traitement des cellules avec le S23906-1 (*figure 82*).

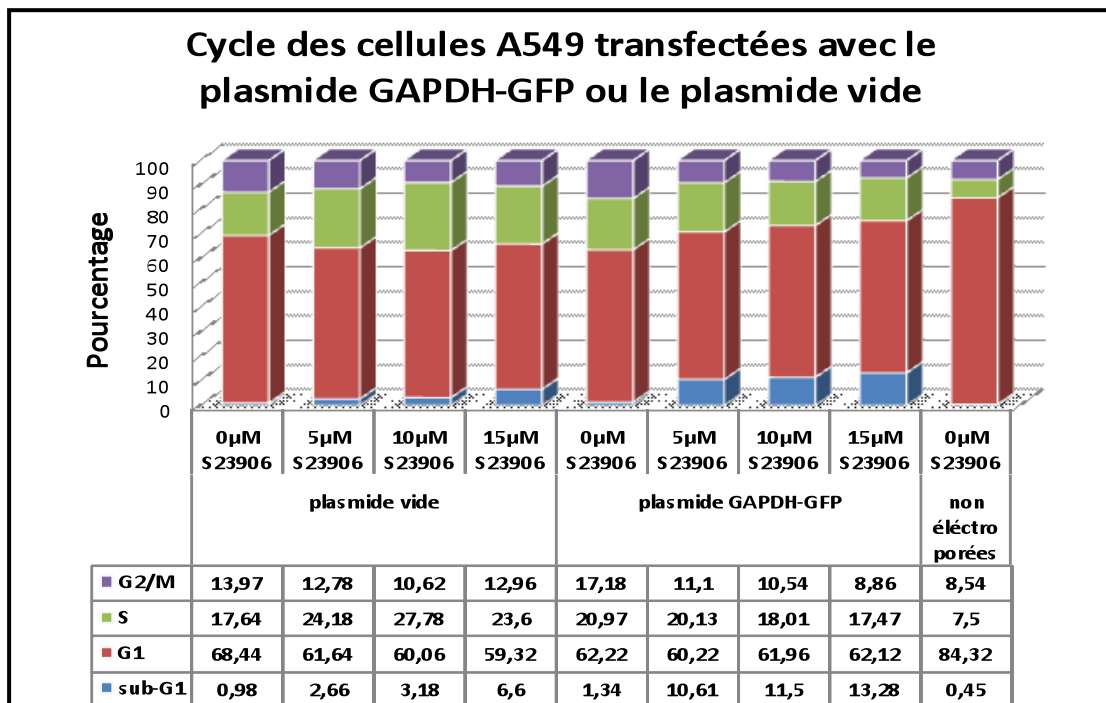


Figure 82: Expérience de cycle cellulaire réalisé sur les cellules A549 transfectées pendant 24H en présence versus en absence du plasmide puis traitées avec le S23906-1. 60.000 cellules A549 sont transfectées avec 2,5µg de vecteur exprimant la GAPDH-GFP ou de vecteur vide. Le taux de transfection est contrôlé par visualisation du taux de fluorescence par microscopie. Après 24H à l'étuve, les cellules sont traitées pour 48H supplémentaires avec 0, 5, 10 ou 15µM de S23906-1.

Cette expérience préliminaire n'a cependant été réalisée qu'une seule fois et demande à être répétée. Si elle se confirme, l'apparition de phase sub-G1 (assimilé à l'apoptose des cellules) montre que la surexpression de la GAPDH sensibiliserait les cellules A549 au S23906-1. Nous observerions alors les mêmes résultats obtenus avec les cellules fibroblastiques R6 montrant que les cellules transfectées par le vecteur GAPDH-GFP sont sensibles à l'apoptose [213]. Cependant, ces résultats doivent être répétés et le taux global de GAPDH mesuré dans les cellules après transfection.

4.2. Etude de la localisation cellulaire de la GAPDH endogène après traitement au S23906-1

Des expériences de microscopie confocale (Zeiss LSM710) ont été réalisées sur les cellules HT-29 et A549 afin de déterminer la localisation de la GAPDH endogène après 24H de traitement en présence de 2,5 ou 5 μ M de S23906-1.

4.2.1. Cellules A549

Nous avons utilisé le H₂O₂ comme contrôle positif de translocation pour mettre au point cette technique de microscopie. Les cellules sont incubées pendant 1H avec 1 mM de H₂O₂ et remises en culture 24H avec du milieu neuf. En parallèle, les cellules sont également traitées avec 2,5 ou 5 μ M de S23906-1 pendant 24H avant d'être fixées en présence de DAPI comme marqueur nucléaire. Les cellules sont ensuite visualisées en microscopie confocale (*figure 83*).

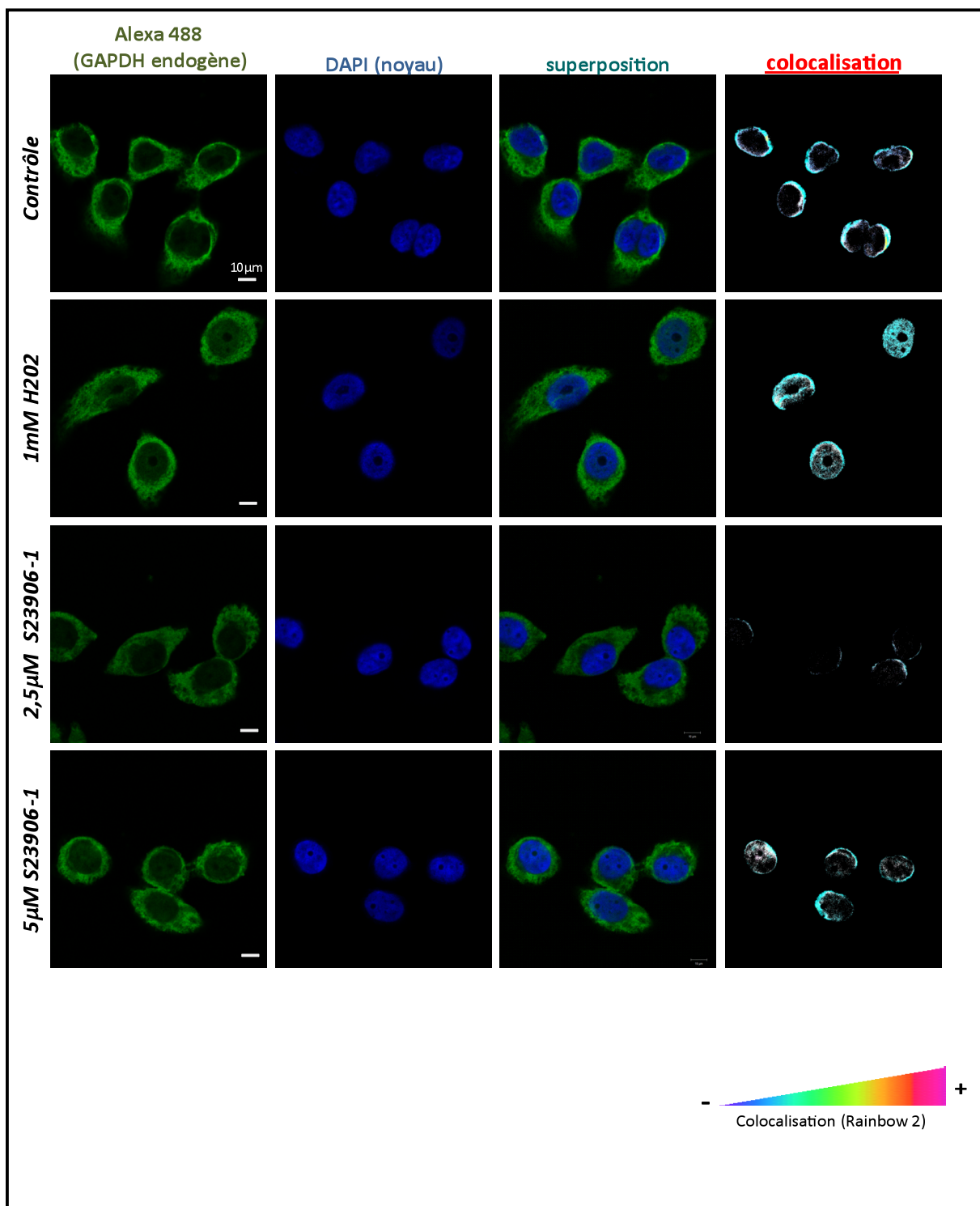


Figure 83: Localisation de la GAPDH endogène après traitement des cellules A549 avec le S23906-1, étude de colocalisation avec le noyau. 60.000 cellules A549 sont traitées ou non avec 1mM de H₂O₂, 2,5 ou 5µM de S23906-1. Les cellules A549 sont marquées avec un anticorps secondaire fluorescent marquant la GAPDH endogène (vert). Le noyau est marqué au DAPI (bleu). La superposition et la colocalisation (couleur rainbow 2) des deux fluorochromes a été réalisée avec le logiciel ZEN 2009. Plus la couleur de superposition est rose, plus il y a colocalisation entre les pixels verts et les pixels bleus.

Nous observons que la GAPDH est déjà présente en faible quantité dans le noyau des cellules A549 sans traitement préalable. Suite au traitement avec H_2O_2 , nous observons une augmentation de la colocalisation entre la GAPDH et le noyau, montrant une augmentation de la quantité de GAPDH dans le noyau, excepté dans le nucléole. Nous observons également une colocalisation de la GAPDH dans les noyaux des cellules traitées avec $5\mu M$ de S23906-1, mais de manière moins importante. De manière surprenante, nous observons une diminution de la quantité de GAPDH dans le noyau des cellules après un traitement avec $2,5\mu M$ de S23906-1.

4.2.2. Cellules HT-29

Selon le protocole utilisé pour les cellules A549, nous avons testé en parallèle le taux de translocation de la GAPDH suite à un traitement avec H_2O_2 au sein des cellules HT-29.

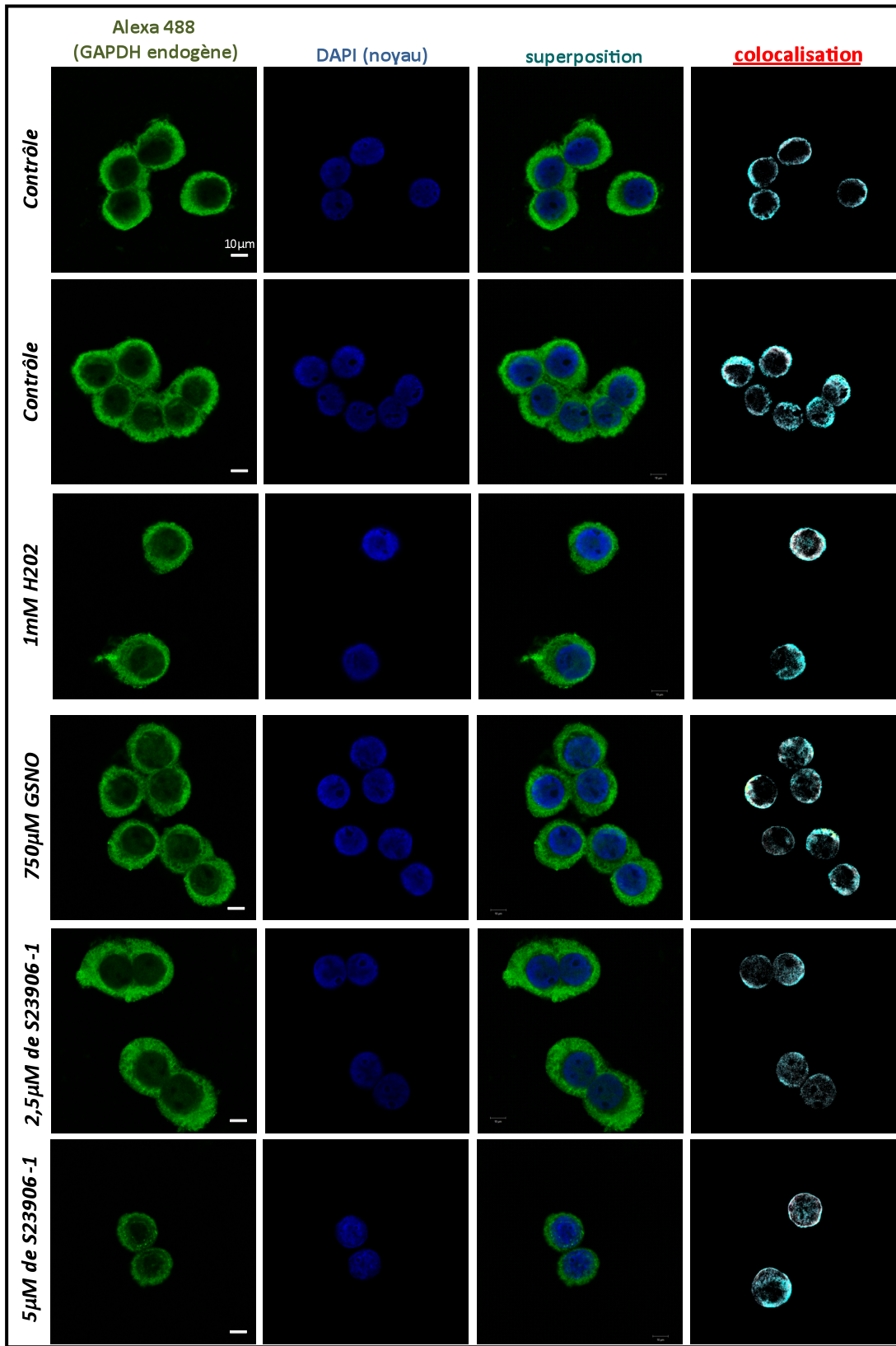


Figure 83: Localisation de la GAPDH endogène après traitement des cellules HT-29 avec le S23906-1, étude de colocalisation avec le noyau. 60.000 cellules HT-29 sont traitées ou non avec 1mM de H₂O₂, 750µM GSNO, 2,5 ou 5µM de S23906-1. Les cellules HT-29 sont marquées avec un anticorps fluorescent (alexa 488). Le noyau est marqué au DAPI (bleu). La superposition et la colocalisation (couleur rainbow 2) des deux fluorochromes a été réalisée avec le logiciel ZEN 2009. Plus la couleur de superposition est rose, plus il y a colocalisation entre les pixels verts et les pixels bleus.

La GAPDH endogène des cellules HT-29 n'est pas équitablement répartie entre toutes les cellules observées au microscope confocal. La GAPDH est en effet présente en quantité plus ou moins importante au sein du noyau des cellules. Globalement et comme pour l'expérience avec les cellules HT-29, il y aurait une faible, voir pas du tout de translocation nucléaire de la GAPDH suite au traitement des cellules avec le S23906-1.

4.2.3. Validation par western-blot

Ces expériences de microscopie doivent être validées par une autre approche, telle que l'extraction fractionnée des différents compartiments cellulaires, suivi d'un western-blot. Les cellules sont traitées ou non avec 5 μ M de S23906-1 (*figure 84*).

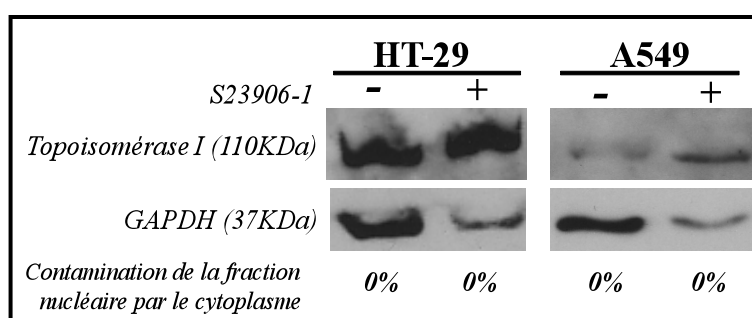


Figure 84: GAPDH nucléaire après traitement ou non avec 5 μ M de S23906-1 des cellules HT-29 et A549. La contamination du noyau par le cytoplasme est mesurée par dosage de la β -galactosidase présente dans la fraction nucléaire par rapport à la fraction cytoplasmique.

La quantification des bandes des western-blots par ImageQuant a montré une diminution de la quantité de GAPDH nucléaire d'un facteur 3 suite au traitement des cellules HT-29 et d'un facteur 9 pour les cellules A549 traitées.

Ces expériences valident l'absence de translocation nucléaire de GAPDH endogène des cellules A549 et montrent également une diminution globale de la quantité en GAPDH nucléaire dans les cellules HT-29.

Des expériences réalisées sur 1 million de cellules sensibles (KB3.1) et résistantes (KB500) au S23906-1 ont montré que ce composé se fixait à hauteur de 3 molécules pour environ 1 million de pb après 1H d'incubation avec 1 μ M de S23906-1 dans 300 μ L de milieu [112]. Il serait alors intéressant d'évaluer le taux de GAPDH recrutée à la chromatine après traitement des cellules au S23906-1.

5. Conséquences cellulaires de l'interaction

GAPDH/adduits

Afin de mieux comprendre les conséquences du recrutement de la GAPDH au niveau des adduits ADN/S23906-1 en général, nous avons utilisé une approche d'ARN interférence pour diminuer l'expression globale de la GAPDH. Suite à la transfection par siRNA les cellules deviennent plus ou moins sensibles à divers agents cytotoxiques/cytostatiques [308]. Nous avons vérifié l'effet de cette inhibition d'expression de la GAPDH sur l'activité cytotoxique du S23906-1 au niveau de nos lignées cellulaires.

5.1. Cellules HT-29

L'implication de la GAPDH dans l'activité cytotoxique du S23906-1 est mesurée par l'observation du cycle et du taux de survie (MTS) des cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre la GAPDH puis traitées ou non par des concentrations croissantes en S23906-1.

5.1.1. Invalidation transitoire de la GAPDH

Nous avons choisi de transfecter nos cellules par lipofection, une méthode qui induit beaucoup moins de mort cellulaire que l'électroporation. Les quantités de lipofectamine et de siRNA ont été optimisées (voir le Matériel et Méthodes) afin d'obtenir un taux protéique au plus bas et un taux de survie au plus haut avant traitement au S23906-1.

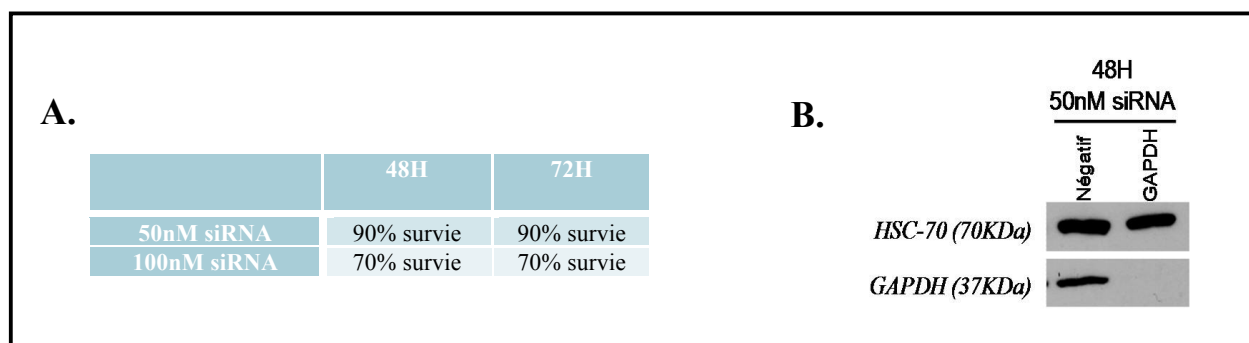
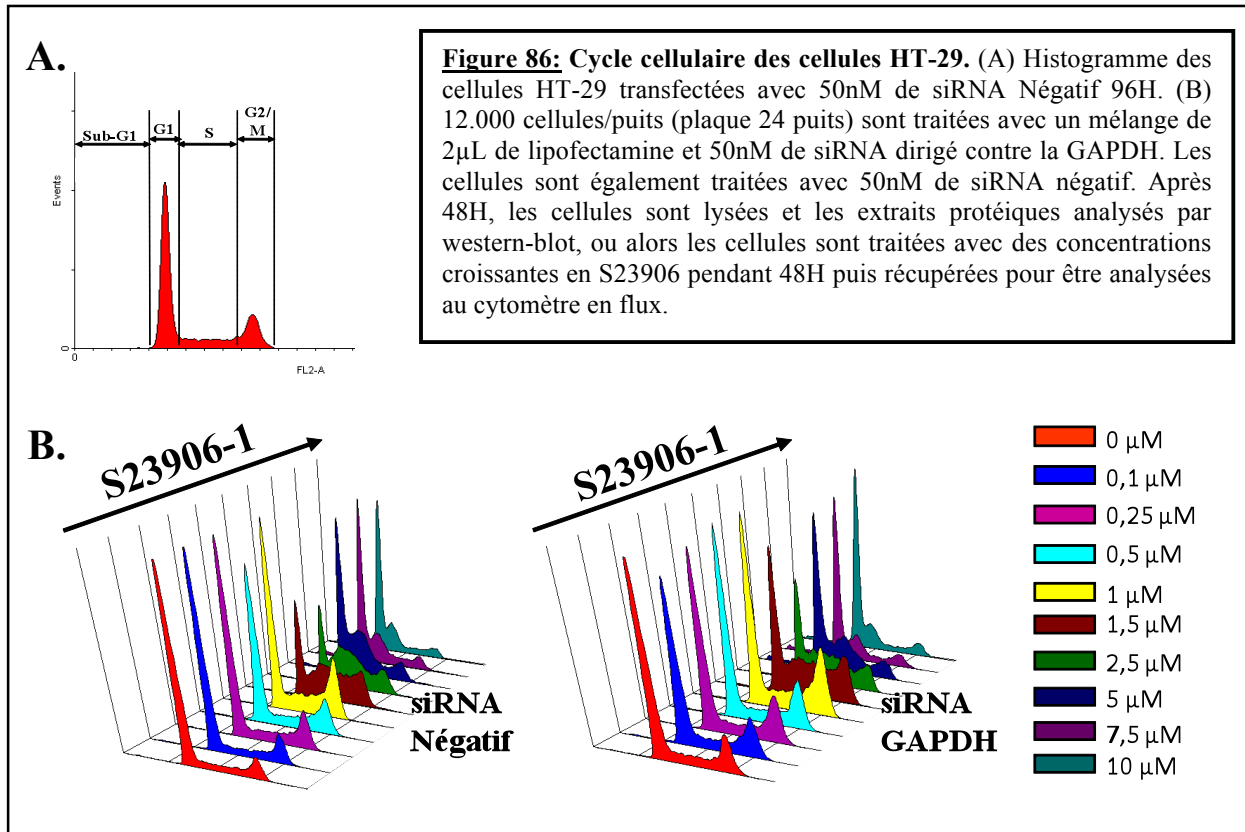


Figure 85: Diminution de la quantité protéique de GAPDH après traitement avec un siRNA dirigé contre la GAPDH. (A) 3.000 cellules/puits (plaque 96 puits) sont transfectées avec un mélange de 0,5µL de lipofectamine et 50 ou 100nM de siRNA dirigé contre la GAPDH. Après 48H ou 72H, les cellules sont incubées pendant 1H avec 20µL de réactif MTS. (B) 12.000 cellules sont traitées avec un mélange de 2µL de lipofectamine et 50nM de siRNA dirigé contre la GAPDH. Les cellules sont également traitées avec 50nM de siRNA négatif. Après 48H, les cellules sont lysées et les extraits protéiques analysés par western-blot. La protéine HSC-70 est utilisée comme contrôle de dépôt.

Des expériences ont été réalisées en parallèle afin de voir si la présence de siRNA dirigé contre la GAPDH modifiait le cycle des cellules traitées au S23906-1. Les histogrammes sont obtenus après analyse au cytomètre de flux (FACScan) puis normalisés via le logiciel WinMDI (cf Matériel et Méthodes) (figure 86).



Aucune différence de cycle cellulaire n'a été observée entre les cellules HT-29 transfectées avec un siRNA négatif et avec un siRNA dirigé contre la GAPDH puis traitées avec le S23906-1. Cela suggère que la GAPDH est peu impliquée dans l'effet cytotoxique du S23906-1 des cellules HT-29.

5.1.2. Survie des cellules transfectées avec le siRNA puis traitées au S23906-1

Pour nos études de cytotoxicité, les cellules sont transfectées avec 50 nM de siRNA, puis, après 48H, elles sont traitées avec des concentrations croissantes en S23906-1 pour une durée de 72H supplémentaires (figure 87).

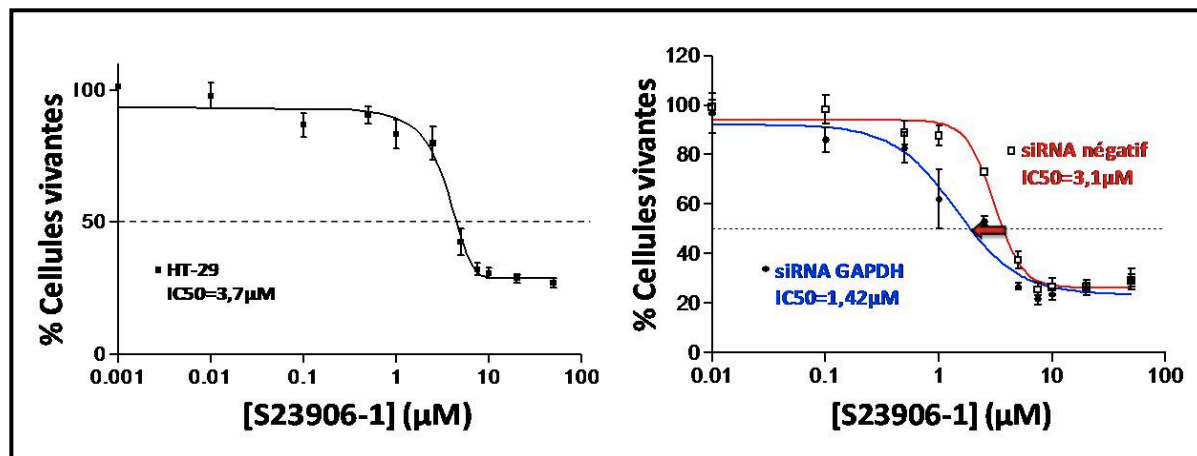


Figure 87: Courbes de survie des cellules HT-29 après traitement au S23906-1. (A) 3.000 cellules/puits (plaque 96 puits) sont traitées avec des concentrations croissantes en S23906-1 pendant 72H. (B) 3.000 cellules/puits (plaque 96 puits) sont transfectées avec un mélange de 0,5μL de lipofectamine et 50nM de siRNA dirigé contre la GAPDH ou de siRNA négatif. Après 48H, les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes en S23906-1. Après 72H supplémentaires, les cellules sont incubées pendant 1H avec du réactif MTS.

L'IC₅₀ est réduite d'un facteur 2 lorsque les cellules expriment moins de GAPDH, ce qui suggère que la GAPDH est plutôt impliquée dans l'effet protecteur de la cytotoxicité induite par le S23906-1 sur les cellules HT-29. Cet effet est contraire à celui observé avec les cellules A549 traitées avec un dérivé de la Saframycine A. Cette observation renforce l'hypothèse d'un rôle différent de la GAPDH au sein d'une même cellule, suite à différents stimuli.

5.2. Cellules A549

Les cellules A549 présentent quasiment la même sensibilité au S23906-1 que les cellules HT-29 (figure 88).

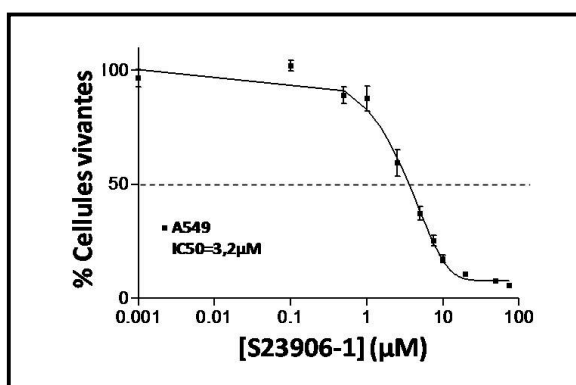
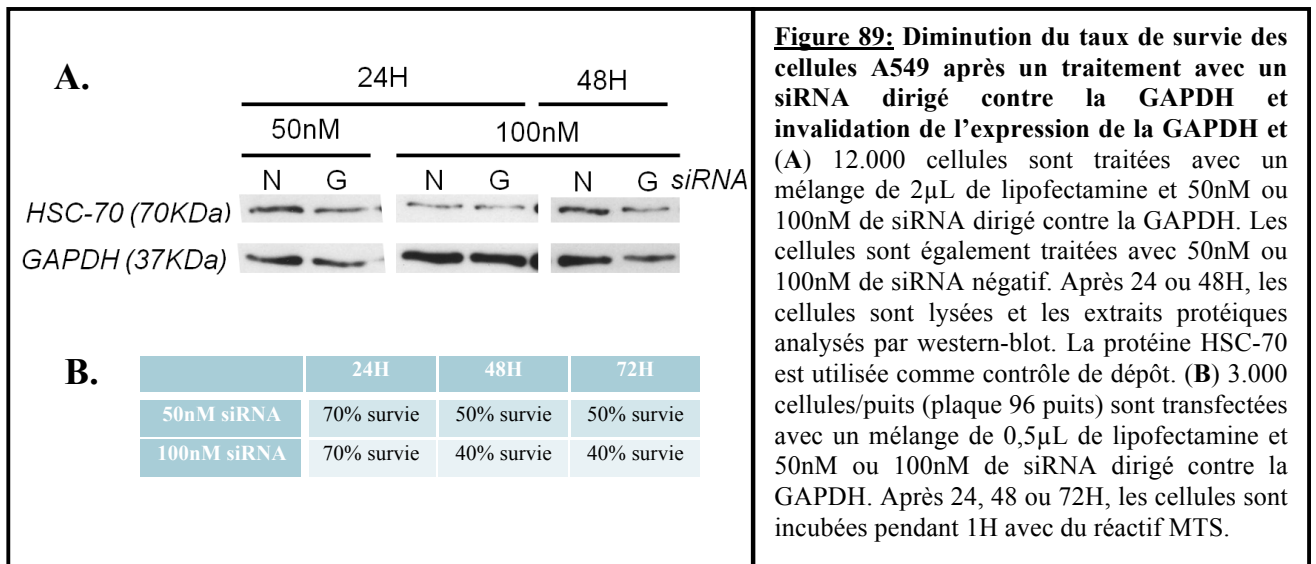


Figure 88: Courbes de survie des cellules A549 après traitement au S23906-1. 3.000 cellules/puits (plaque 96 puits) sont traitées avec des concentrations croissantes en S23906-1 pendant 72H. Les cellules sont incubées pendant 1H avec du réactif MTS.

Nous nous sommes basés sur le même mode opératoire que celui des cellules HT-29 dans la caractérisation des quantités en siRNA à administrer aux cellules. Cependant, nous

avons rencontré des difficultés techniques : le traitement des cellules avec 50nM ou 100nM de siRNA n'a pas induit une diminution du taux protéique de GAPDH après 24H (*figure 89A*) et seulement une faible diminution de l'expression avec 100nM de siRNA après 48H. De plus, les cellules A549 sont beaucoup plus sensibles à une diminution du taux global de GAPDH puisque le taux de survie de celles-ci chute fortement après transfection avec le siRNA (*figure 89B*).



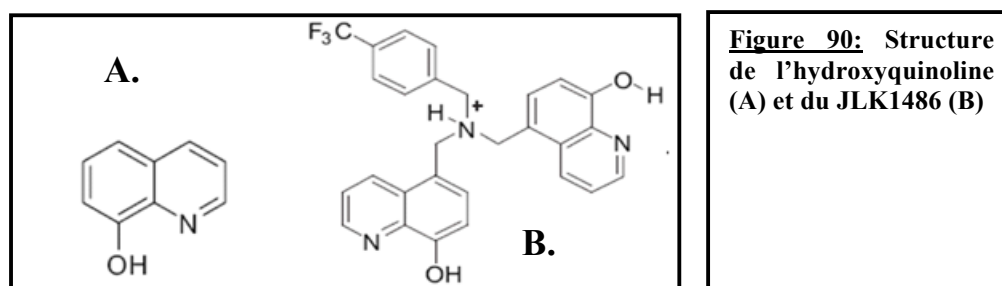
Dans la littérature, il est en effet indiqué que les cellules A549 déplétées en GAPDH présentent un arrêt de la prolifération cellulaire, avec une accumulation en phase G0/G1, et cela même en présence de pyruvate dans le milieu de culture pour compenser l'activité glycolytique de l'enzyme [308]. Il faut noter qu'il a déjà été montré que la GAPDH serait en effet impliquée dans le maintien d'une prolifération correcte de certaines cellules, notamment les cellules A549 (translocation en phase S du cycle, arrêt du cycle après un traitement doxorubicine) (cf introduction). Enfin la déplétion en GAPDH induirait un arrêt du cycle cellulaire via l'activation de p53 et de p21 (inhibiteur de cdk).

Nous devons alors renouveler l'expérience en débutant avec des quantités plus importantes de cellules A549 transfectées pendant 48H avec une quantité plus importante en siRNA (150nM) et qui seront ensuite comptées pour avoir le même nombre de cellules avant traitement au S23906-1.

Partie II : Projet JLK1486

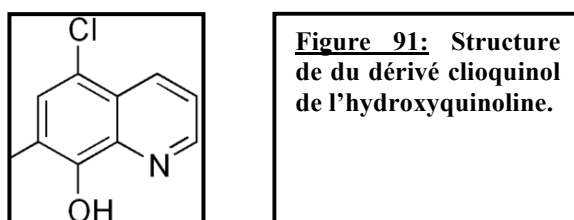
1. Introduction

Des dérivés bis-8-hydroxyquinolines substitués de benzylamines ont été synthétisés par l'équipe du Pr Jean-Louis Kraus de l'université de Méditerranée, dont le composé JLK1486 (4-fluoro-5benzylamine-5(8-hydroxyquinoline) 8-hydroxyquinoline) (*figure 90*) [309].



Le JLK1486 a été sélectionné pour sa remarquable activité cytotoxique comparable à celle du docetaxel (analogue du paclitaxel, inhibiteur la dépolymérisation des microtubules) sur les cellules KB3 (carcinome cervical). Le composé présente également une activité cytotoxique plus ou moins importante sur de nombreuses autres lignées cancéreuses dont les cellules A549, HCT-116 et HCT15 [309].

Des recherches ont été entreprises afin de comprendre le mécanisme d'action de cette molécule prometteuse. Le composé n'intervient pas dans la polymérisation/dépolymérisation des microtubules. De plus, si la 8-hydroxyquinoline et le dérivé clioquinol (*figure 91*) sont capables d'inhiber le protéasome de manière Cu^{2+} -dépendante et ainsi d'induire la mort des cellules, le JLK1486 n'a pas d'effet sur l'activité du protéasome [309, 310].



Il a été montré également que le JLK1486 serait un substrat potentiel de la Pg-P (glycoprotéine P, une pompe d'efflux des drogues). Enfin, le JLK1486 active les caspases 3/7, sans activer les caspases 8 ou 9. [309].

Le JLK1486 induirait donc la mort cellulaire par une autre voie de signalisation. Le composé pourrait générer, en présence d'un nucléophile, des intermédiaires quinone methide, qui deviendraient alors des agents potentiellement alkylants (*figure 92*) [311].

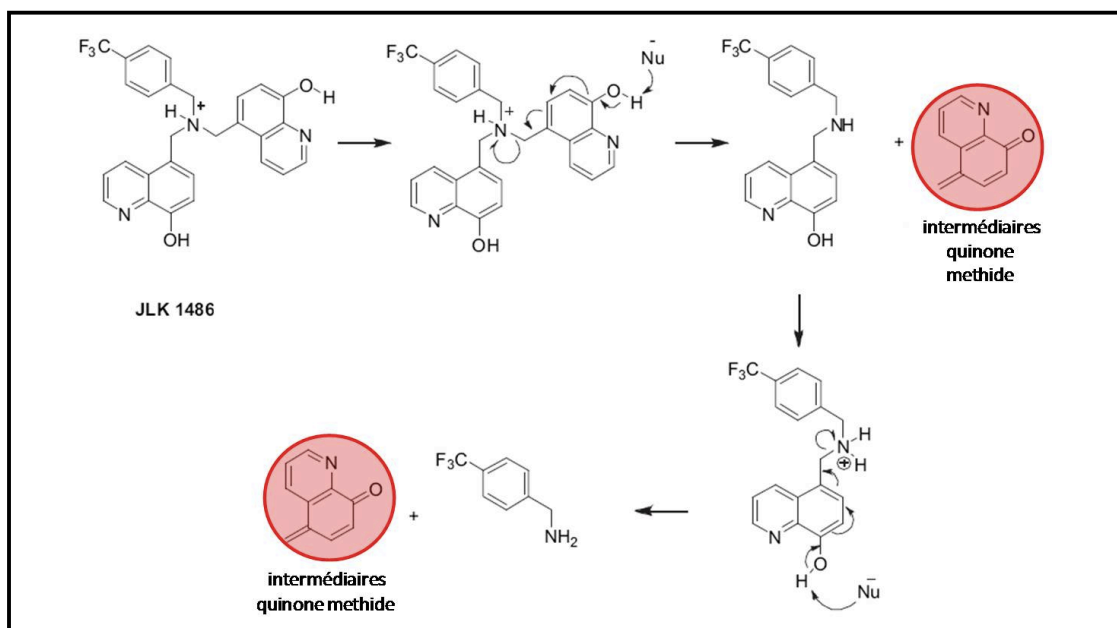


Figure 92: Hypothèse du mécanisme d'action du JLK1486.

Ces intermédiaires du JLK1486 pourront alors interagir avec des groupements électrophiles tels que $-OH$, $-NH_2$, $-SH$ ou $-COOH$ présents au sein des protéines et des acides nucléiques. Ces interactions seraient alors impliquées dans l'activité cytotoxique du JLK1486. L'objectif de nos travaux est donc de déterminer quelles sont les cibles potentielles du JLK1486 afin de mieux comprendre son mécanisme d'action conduisant à la mort des cellules.

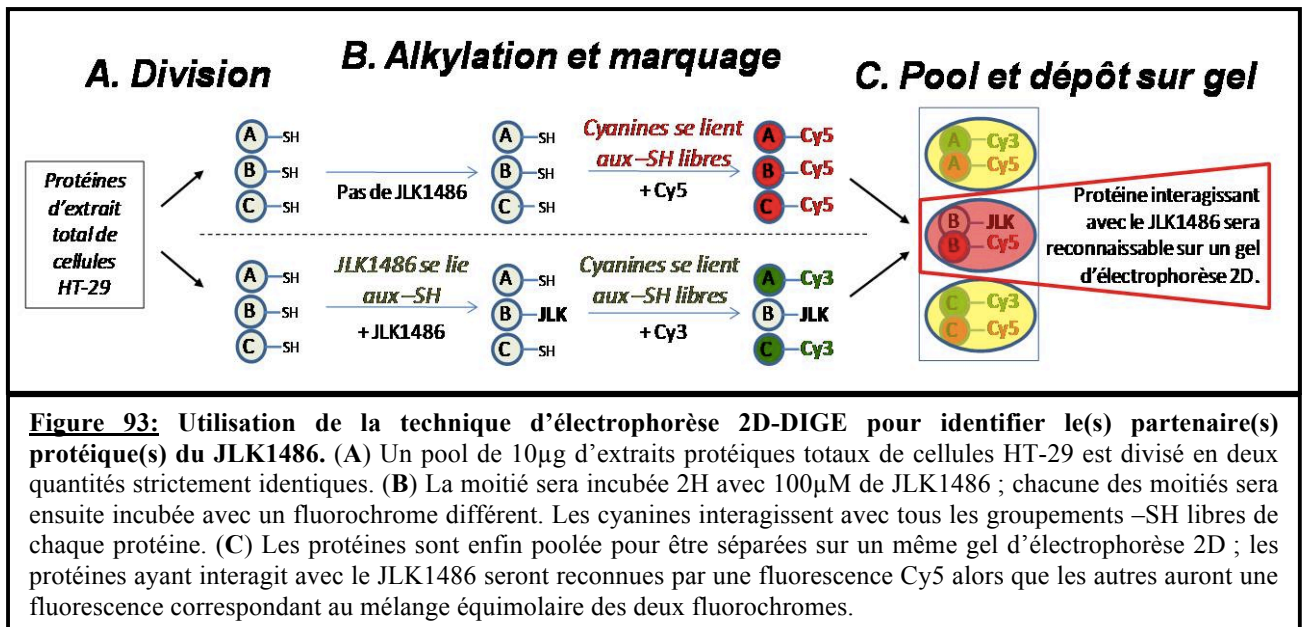
2. Recherche d'une cible nucléotidique et peptidique

Nous avons entrepris des expériences de spectrométrie (EI-MS, dichroïsme circulaire, UV/visible et T_m) et des approches biochimiques. Celles-ci n'ont pas mis en évidence d'interactions covalentes entre le JLK1486 et l'ADN, mise à part une interaction avec une désoxyguanosine seule, mais plutôt avec les groupements thiols du GSH (glutathion). Ces résultats sont exposés dans l'article Madonna et al. (European Journal of Medicinal Chemistry, 2009) situé en annexe.

Par utilisation de BSO (inhibiteur de la synthèse de GSH) nous avons montré que l'interaction au GSH diminue l'effet cytotoxique du JLK1486 par un effet de détoxification comme montré auparavant avec le S23906-1 (voir introduction 3.2.2). Puisque les dérivés du JLK1486 qui ne présentent pas d'intermédiaires alkylant sont moins cytotoxiques, et que la cible principale n'est pas l'ADN, le JLK1486 doit sûrement interagir avec une ou plusieurs protéine(s). Ainsi le JLK1486 bloquerait ou activerait les fonctions de celle(s)-ci, ce qui conduirait à la mort de la cellule. Des expériences d'électrophorèse 2D-DIGE ont été réalisées afin d'identifier les autres cibles protéiques potentielles du JLK1486.

3. Recherche d'une cible protéique

Sachant que le JLK1486 a la capacité de se fixer à certains groupements –SH, nous avons dévié l'utilisation classique de la 2D-DIGE (figure 93). Nous utilisons le marquage de saturation qui va permettre de marquer toutes les cystéines libres de toutes les protéines. Nous disposons de 2 fluorochromes (Cy3 et Cy5) qui se fixent sur les groupements –SH des cystéines.



Afin d'éviter les faux positifs, deux gels d'électrophorèse 2D inverses (gels analytiques) sont réalisés. C'est-à-dire que dans le premier gel, les protéines préalablement incubées avec le JLK1486 sont marquées avec Cy3, alors que dans le second gel, les protéines préalablement incubées avec le JLK1486 sont marquées avec Cy5. Les protéines d'intérêt

ayant fixé le JLK1486 ne pourront pas fixer le fluorochrome, il sera alors possible de sélectionner les protéines interagissant avec le JLK1486. Deux solutions protéiques préparées à des temps différents ont été testés (*lot de protéines n°1 ou n°2, figure 94*), et pour chacune d'elles, 3 expériences comprenant à chaque fois de 2 gels inverses ont été réalisés. Deux gels inverses de chacune des séries sont représentés dans la figure ci-dessous.

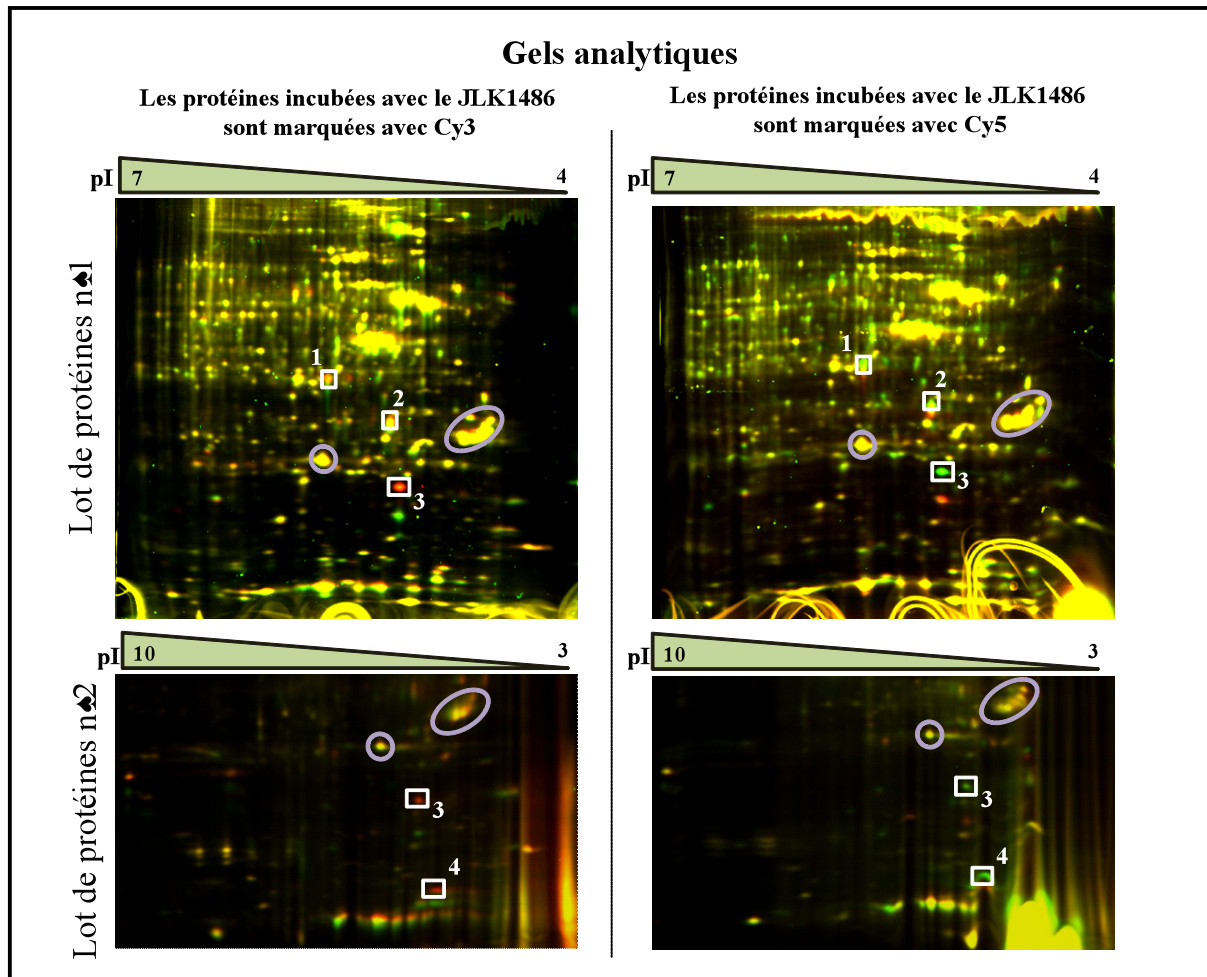


Figure 94: Electrophorèse 2D-DIGE des protéines incubées ou non avec le JLK1486. Les expériences sont réalisées en triplicata pour chacun des lots protéiques. Les protéines fluorescentes du lot n°1, incubées ou non avec le JLK1486, ont été déposées sur des strips 4-7 et la seconde dimension a été réalisée sur un gel d'acrylamide 8-16%. Les protéines fluorescentes du lot n°2, incubées ou non avec le JLK1486, ont été quant à elle déposées sur des strips 3-10 et la seconde dimension a été réalisées sur un gel d'acrylamide 9-15%. Les cercles sont des références et permettent de comparer les gels entre eux. Le différentiel de fluorescence observé au niveau des spots 3 et 4 montrent déjà une interaction potentielle entre les protéines contenues dans celui-ci et le JLK1486. L'analyse des gels par le logiciel SameSpot a ensuite mis en évidence deux autres spots intéressants. Le spot 3 est retrouvé sur les gels des deux lots de protéines.

Une fois les gels analytiques réalisés, ceux-ci sont scannés et analysés par le logiciel SameSpot qui va pouvoir identifier la variation d'intensité de fluorescence entre les protéines marquées par les deux fluorochromes différents.

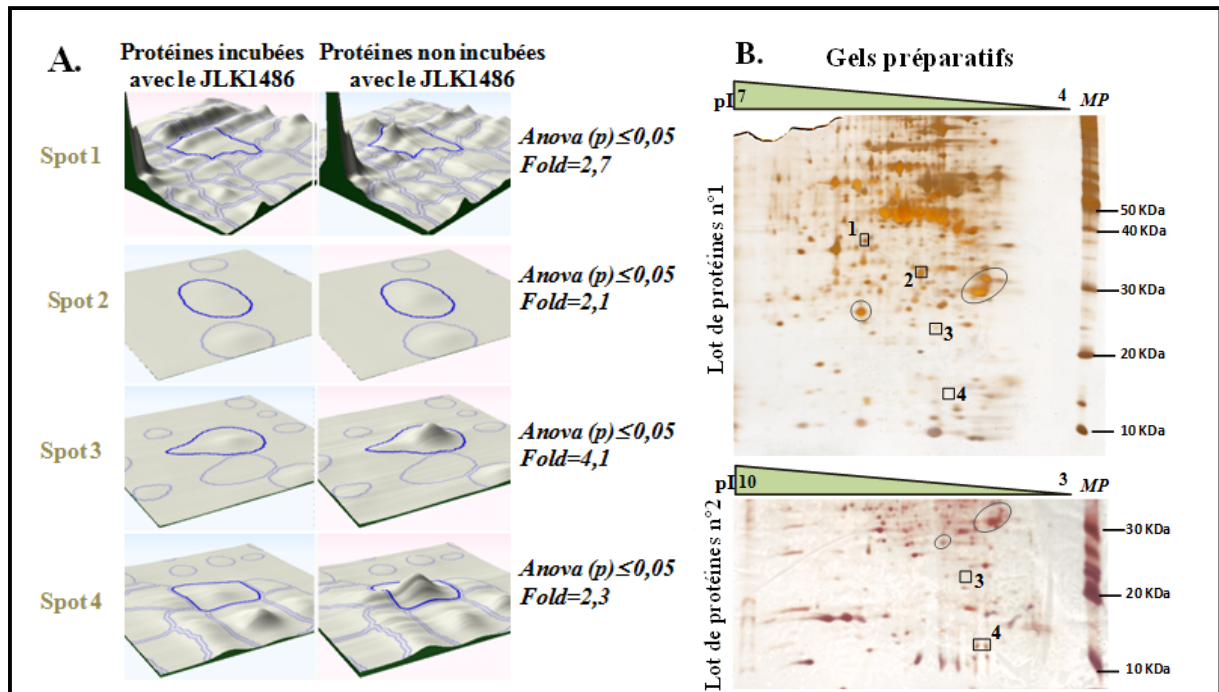


Figure 95: Analyse SameSpot des gels analytiques et comparaison au gel préparatif (A) Les gels analytiques de chacune des séries sont analysés par le logiciel SameSpot. Pour chacun des spots, le ratio (« fold ») est calculé, ce qui correspond à la différence d'intensité observée entre les protéines non incubées avec le JLK1486 et celles incubées avec le JLK1486. Les données sont significatives si $ratio > 1,5$ et $p\text{-value} \leq 0,05$. La variabilité (anova) entre les gels inverses d'une même série doit en effet être inférieure à 5%. (B) Les spots d'intérêt fluorescents sont repérés sur les gels préparatifs, ils sont ensuite excisés pour être identifiés.

Cette analyse a permis de mettre en évidence quatre spots d'intérêt, dont deux (3 et 4) qui était déjà identifiable avant l'analyse SameSpot. Le spot n°3 est le plus intéressant puisqu'il est retrouvé dans les gels des deux lots de protéines différents. Afin d'identifier les protéines contenues dans chacun des spots et qui interagiraient potentiellement avec le JLK1486, des gels préparatifs ont été réalisés. Une plus grande quantité de protéines est déposée sur ces gels d'électrophorèse 2D classique. Par comparaison avec les gels analytiques, les spots d'intérêt sont excisés afin d'être ensuite analysés par MALDI-TOF et identifiés via les banques de données. Cependant le spot n°3 qui représente le plus grand intérêt est très peu visible sur les gels d'électrophorèses. Malheureusement les analyses MALDI-TOF ont été infructueuses à cause de la trop faible quantité de matériel protéique dans chacun des spots.

Il sera donc important de renouveler l'expérience en augmentant la quantité de protéines déposées par gel d'électrophorèse mais aussi de réaliser plusieurs gels, permettant ainsi de pooler les spots d'intérêt et d'augmenter les chances d'identification en MALDI-TOF.

Partie III : Etude de composés dérivés de la nitidine

La nitidine est une molécule à activité anti-néoplasique. Elle inhibe l'activité de la topoisomérase I aussi efficacement que la camptotécine, mais elle inhibe aussi la topoisomérase II. Malgré cela, la nitidine présente une activité cytotoxique beaucoup moins importante que la camptotécine sur plusieurs lignées cancéreuses [312]. Afin d'augmenter l'efficacité antitumorale, d'autres dérivés ont été synthétisés, dont les composés de la série benzo[*c*]phenanthrolinones substitués en N5 et les composés de la série benzo[*c*]phenanthrolines substitués en C6.

Pour ce travail de collaboration entre chimistes et biologistes, ma contribution a été d'évaluer la cytotoxicité de chacun des composés, leur efficacité d'interaction à l'ADN comparativement à la camptotécine, et ainsi appréhender leur activité inhibitrice de topoisomérases.

Les résultats et discussions de ces travaux ont été soumis au European Journal of Medicinal Chemistry (Genès et al.).

Partie IV : Etude de dérivés pyrido- et thienocarbazoles de l'ellipticine

L'ellipticine est une molécule à activité anti-néoplasique, elle s'intercale à l'ADN et inhibe indirectement l'activité de la topoisomérase II. Dans le but de cibler un plus large panel de tumeurs, des dérivés ont été synthétisés, dont les dérivés pyrido- et thienocarbazoles. Nous avons évalué leur capacité de liaison à une séquence spécifique de l'ADN de chacun des composés et d'inhibition de l'activité de la topoisomérase I et II, ainsi que leur effet sur le cycle cellulaire et leur cytotoxicité respectives.

Les résultats sont exposés dans l'article Lemster T. et al. (European Journal of Medicinal Chemistry, 2009) situé en annexe (figures 1 à 7 et Tableaux 3 à 5).

Ma contribution à ce travail collaboratif a porté sur l'ensemble des données cellulaires (cycle et mesures de la cytotoxicité) ainsi qu'à certaines mesures spectroscopiques.

CHAPITRE IV :
Conclusion et
Perspectives

L'efficacité d'un traitement anti-tumoral est corrélée à l'utilisation d'une ou plusieurs molécules qui ciblent les voies signalétiques de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose, ou directement l'ADN, de manière à viser les cellules tumorales sans trop affecter les cellules saines. Par exemple, le Glivec[®] est un composé très efficace de thérapie ciblée, synthétisé et sélectionné pour inhiber spécifiquement l'activité enzymatique de la protéine de fusion Bcr-Abl, protéine qui n'est exprimée que dans les leucémies myéloïdes chroniques. Toutefois, tous les cancers ne présentent pas une cible clairement identifiée, il est alors important de continuer à développer de nouvelles molécules à large spectre d'action, comme les agents alkylants l'ADN, pour lesquels il est important d'évaluer des composés aux mécanismes d'action variés pour pallier aux résistances et qui présenteront une plus grande tolérance et une plus faible toxicité, en mono- ou poly-chimiothérapie.

Dans ce cadre, mon projet de thèse s'est orienté sur deux grands axes autour du développement de nouveaux agents alkylants.

1. Mécanisme d'action du S23906-1

A ce jour, les lésions de l'ADN les plus toxiques induites par ce type d'agents sont les crosslinks interbrins (ICLs). Cependant, la plupart de ces agents ne forment qu'un faible pourcentage d'ICLs par rapport à la quantité totale de molécules liées à l'ADN. Afin de mieux comprendre par quel moyen certains agents alkylants sont plus cytotoxiques que d'autres et pour développer des composés plus efficaces et moins toxiques, l'identification du type de liaison à l'ADN (grand/petit sillon, stabilité de la double hélice), ainsi que l'étude du mécanisme d'action et des conséquences cellulaires sont importants. Cela a permis en effet de mettre en évidence le recrutement de protéines de la machinerie cellulaire au niveau de certains adduits de l'ADN, ce qui aura pour conséquence l'augmentation de l'activité cytotoxique de la molécule (ex : HMG-B1 pour le cisplatine [61], XPG pour l'ET-743 [87]).

1.1 Interaction à l'ADN et déstabilisation

Parmi les modifications de la structure de l'ADN induites par les agents alkylants, la déstabilisation de la double hélice est un phénomène rare et tout à fait original. Comme indiqué dans notre revue (voir page 49), très peu de molécules présentent cette capacité, parmi lesquels le S23906-1. Ce dernier est un dérivé de l'acronycine qui induit un arrêt du cycle cellulaire et/ou la mort par apoptose ou par « catastrophe mitotique » comme la plupart des agents anti-tumoraux. Cependant, le non-conformisme de la molécule au niveau de son

interaction à l'ADN (petit sillon et ouverture locale) expliquerait le fait d'une activité cytotoxique et anti-tumorale équivalente à celles de certains agents de chimiothérapie déjà utilisés en clinique.

Les approches de spectrométrie de masse entreprises au cours de cette étude ont montré en effet que cet agent se lie au niveau des guanines (position N2), ce que nous avons confirmé plus récemment. De plus, notre travail a montré que certains dérivés du S23906-1, ainsi que l'isomérisation même de ce composé, induisait une ouverture plus ou moins importante de l'hélice. L'étude de la cytotoxicité et des activités anti-tumorales des stéréo-isomères du S23906-1 ont montré une corrélation entre l'efficacité de déstabilisation de la double hélice et leur activité anti-tumorale (voir page 100).

A la différence des autres agents alkylant le petit sillon connus, cette interaction originale tend donc à penser à l'existence d'un mode d'action nouveau pour lutter contre la prolifération des cellules tumorales. La modification structurale de l'ADN engendrée par la formation de l'adduit S23906-1/ADN pourrait alors permettre ou empêcher la fixation de protéines nucléaires (structurales, enzymes de réparation, facteurs de transcription) et ainsi contribuer à l'activité cytotoxique du composé.

1.2 Identification des protéines GAPDH et HMG-B1 comme partenaires des adduits S23906-1/ADN et conséquences cellulaires

Au cours de ce travail, nous avons évalué la capacité des adduits S23906-1/ADN à inhiber ou recruter des facteurs de transcription à leur séquence cible, comme cela a déjà été observé pour l'ET-743 qui inhibe la fixation de NF- κ B à sa séquence cible [81]. Par une évaluation parallèle des capacités d'interaction à leur cible d'environ 400 facteurs de transcription, nous n'avons pas identifié d'inhibition de fixation de facteurs de transcription à l'ADN. Par contre, des augmentations de formation de complexes protéiques sur certaines séquences cibles ont été observées, comme c'est le cas de Smad/SBE.

Si cette séquence oligonucléotidique activée en réponse à un signal extracellulaire induit par TGF- β nous paraissait tout à fait pertinente dans le cadre de la compréhension du mécanisme d'action du S23906-1, les cellules HT-29 n'expriment pas Smad 4 connue pour interagir au site Smad-SBE avec d'autres protéines de la famille Smad. Le complexe formé au niveau de la séquence Smad-SBE alkylée par le S23906-1 n'impliquant vraisemblablement

pas les facteurs de transcription qui s'y lient classiquement, nous avons recherché quelles étaient ces protéines par une approche de protéomique.

Cette technique a mis en évidence la fixation de deux protéines que nous avons pu identifier par MALDI-TOF : la HMG-B1 et la GAPDH. Nous avons validé l'interaction préférentielle de la GAPDH à l'oligonucléotide double brin alkylé, puis aux mêmes séquences simple brin alkylées, en relation avec l'effet déstabilisant de l'ADN du S23906-1 et des capacités de la GAPDH à interagir avec de l'ADN simple brin [223, 234]. Par contre, aucune interaction directe de la protéine HMG-B1 à l'ADN ni au complexe GAPDH/ADN alkylé n'a été observée, suggérant qu'une autre protéine non identifiée par nos approches de protéomique pourrait relier HMG-B1 à un complexe multi-protéique plus important. A ce titre, il a déjà été montré que ces deux protéines étaient retrouvées au sein du même complexe protéique impliqué dans la voie de réparation MMR indépendante de MutS [252, 253]. Les données de la littérature montrent que les protéines extraites de noyau de cellules déficientes pour la voie MMR dépendante de MutS sont recrutées au niveau d'oligonucléotides présentant un mésappariement G^s.C ou G^s.T (où G^s = thioguanosine générée suite au traitement de l'ADN par la mercaptopurine). La GAPDH a tout d'abord été identifiée au sein de ce complexe lié à G^s [252]. Des études complémentaires sur ces cellules ont montré que l'arrêt du cycle cellulaire suite au traitement à la mercaptopurine ne se faisait qu'en phase S du 2^{ème} cycle. Cette observation suggère que la voie secondaire de réparation reconnaît plutôt une distorsion de l'ADN, en lien avec l'incorporation de dG^s supplémentaires, plutôt qu'un mésappariement [253]. Ces recherches ont permis l'identification des protéines HMG-B1, HMG-B2, HSC-70, ERp60 et de la GAPDH. Cependant, même si chacune des protéines ERp60, HMG-B2 et la GAPDH peut interagir avec l'ADN [253], ce serait plutôt la protéine HMG-B1 qui se fixerait directement à la lésion.

Nos résultats ont indiqué au contraire que la GAPDH interagissait directement à l'adduit S23906-1/ADN alors que HMG-B1 ne le fixait pas directement.

De plus, la lésion pourrait également être reconnue grâce à la déstabilisation de l'ADN plutôt qu'à un mésappariement puisque des expériences effectuées avec un ADN alkylé par des dérivés du S23906-1, qui déstabilisent également l'ADN, recrutent plus efficacement la GAPDH que les dérivés déstabilisant peu l'ADN ou que l'ET-743 qui stabilise l'ADN.

Nos expériences de siRNA dirigés contre la GAPDH ont révélé ensuite une sensibilisation des cellules HT-29 au S23906-1, ce qui conduirait alors à l'hypothèse d'une implication de la GAPDH dans la réparation des lésions de l'ADN. Il serait donc intéressant de vérifier la présence de l'un des composants de la machinerie de la voie MMR indépendante de MutS au sein du complexe GAPDH/ADN alkylé. Pour cela, nous pourrions par exemple récupérer les protéines interagissant à l'ADN alkylé suite à une EMSA puis les identifier par western-blot ou encore invalider par siRNA l'expression de chacune des protéines impliquées dans ce complexe de réparation et évaluer leur impact sur la cytotoxicité du S23906-1.

Il faut rappeler que l'interaction du complexe de la voie MMR indépendante de MutS n'est pas inhibée en présence d'ATP [253], alors que dans nos expériences l'interaction des protéines d'extraits nucléaires de cellules HT-29 à Smad-SBE alkylé est inhibée. Un autre point qui est différent de celui observé pour les cellules déficientes en voie MMR indépendante de MutS [253], est l'absence de translocation nucléaire de la GAPDH suite au traitement des cellules HT-29 ou A549 avec le S23906-1. C'est pour cela que si les recherches d'identification des protéines du complexe de la voie MMR indépendante de MutS sont infructueuses, il sera également intéressant de récupérer et d'identifier les protéines interagissant à un ADN plus long alkylé par chromatographie nano-LC-MSMS

Il faut remarquer également que la localisation de la GAPDH dans le noyau avec ou sans traitement peut avoir différentes conséquences comme le maintien de la prolifération ou l'induction de l'apoptose. Son interaction à l'ADN peut donc avoir diverses conséquences en fonction du type cellulaire.

Pour évaluer le rôle d'une protéine dans un mécanisme particulier, il est possible d'inhiber son expression. Cependant, par rapport aux diverses fonctions de la GAPDH au sein des cellules (et notamment la glycolyse), le siRNA invalidant l'expression de cette protéine doit être utilisé avec précaution. Pour chacune des expériences réalisées, il faut tenir compte de données publiées en 2009 qui montrent que la déplétion de GAPDH active p53 et p21 dans cellules A549 [308] et entraîne ainsi une diminution du taux de prolifération avant même un traitement avec quelque molécule anti-tumorale. Nous avons en effet observé une forte diminution du taux de prolifération pour les cellules A549. C'est pourquoi nous avons préféré, dans un premier temps, évalué l'effet d'une augmentation d'expression de la protéine GAPDH dans ces cellules. Nos résultats préliminaires indiqueraient alors que les cellules

A549 seraient plus sensibles au S23906-1, suggérant que la GAPDH serait impliquée dans l'activité cytotoxique du S23906-1 dans ces cellules. (Figure 82).

Contrairement aux expériences sur les cellules HT-29, une invalidation (même faible) de l'expression de GAPDH dans les cellules A549 par siRNA aboutit à une mort importante des cellules qui n'est pas compatible avec des mesures de cytotoxicité.

Certaines données de la littérature montrent aussi que les cellules A549 transfectées avec le siRNA GAPDH sont plus résistantes à la cytotoxicité induite par QAD [221] ou l'AraC mais ne modifie pas la sensibilité des cellules A549 à la doxorubicine [308]. Nos résultats sur cellules HT-29 transfectées avec le siRNA GAPDH sont au contraire plus sensibles au S23906-1, suggérant que la GAPDH n'est pas impliquée dans l'effet cytotoxique du S23906-1 mais plutôt dans la résistance de la cellule au composé, ce qui rejoint notre hypothèse d'une implication de la GAPDH dans la réparation de l'ADN. Cette augmentation de sensibilité des cellules déplétées en GAPDH a également été montrée dans les cellules Jurkat traitées à la prednisolone (agent cytotoxique n'induisant pas de dommages à l'ADN) [313].

1.3 Localisation de la GAPDH après un traitement au S23906-1

Comme nous l'avons remarqué plus haut, aucune translocation nucléaire de la GAPDH n'a été obtenue au sein de nos modèles cellulaires, on observe au contraire une diminution transitoire du taux de GAPDH dans le noyau des cellules traitées au S23906-1. Il nous faudra évaluer cet effet avec une cinétique plus précise dans les temps courts. Nous nous sommes référés à la littérature pour essayer de comprendre l'intérêt de cette diminution du taux de GAPDH nucléaire. Cependant, celle-ci montre des avis différents. En effet, on peut observer une translocation cytoplasmique de la GAPDH des cellules HEK293 suite au traitement avec H₂O₂ [237] comme on peut observer une translocation nucléaire de la GAPDH dans les cellules de neuroblastome mNB41A3 suite au même traitement [213]. De manière générale, le mécanisme par lequel la translocation d'un compartiment à un autre de la GAPDH induit l'apoptose des cellules n'est pas encore bien connu.

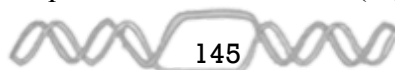
Les résultats obtenus à propos de la translocation cytoplasmique peuvent sembler en contradiction avec une augmentation de fixation de la GAPDH sur l'ADN alkylé. Puisque nos expériences de western-blot ont montré que la GAPDH était déjà présente dans le noyau des

deux lignées cellulaires mais également de manière associée à la chromatine, il est probable que la GAPDH qui interagit avec l'adduit serait une des isoformes déjà localisée dans le noyau. Il sera important pour la suite du projet d'évaluer le taux de GAPDH recrutée au niveau de la chromatine de cellules traitées au S23906-1 par rapport au taux de GAPDH recrutée au niveau de la chromatine de cellules non traitées. Cette expérience nous révélera si globalement la GAPDH se fixe d'avantage à l'ADN alkylé et cela même en présence d'un plus faible taux de GAPDH. Il sera également important de comparer les différentes isoformes de GAPDH fixées à la chromatine alkylée ou non à celles de la GAPDH présente dans le noyau dont une partie peut être libre d'après les différences observées entre nos résultats avec les cellules HT-29 et A549 (figures 56 et 57).

Nous pourrions également identifier l'isoforme de GAPDH qui interagit avec l'ADN alkylé par une étude des modifications post-traductionnelles de la GAPDH nucléaire et purifiée d'érythrocytes humains. Pour cela, il serait possible de séparer les isoformes par la technique Offgel. Celle-ci permet de séparer les protéines selon leur pI sur une strip, mais son avantage est la récupération directe des protéines au sein du tampon disposé dans des cupules au dessus de la strip et à différents niveaux de pI. Ces isoformes seront alors récupérées, incubées avec l'ADN alkylé puis déposées sur un gel retard mais également identifiées en spectrométrie de masse.

1.4 Structure et spécificité de fixation de la GAPDH

Puisque peu d'études ont été réalisées sur les capacités d'interaction de la GAPDH à l'ADN, nous avons évalué sa capacité de fixation à l'ADN, qu'il soit alkylé ou non par le S23906-1. Nos expériences nous ont amené à considérer que la GAPDH ne se fixerait pas au hasard sur l'ADN. En effet, la GAPDH présente une fixation qui dépend de la séquence oligonucléotidique simple ou double brin, de l'agent alkylant, mais également de la modification structurale de la double hélice. Dans la littérature, il a été montré une préférence de fixation de la GAPDH pour les séquences télomériques mais également pour un ADN double brin alkylé par un dérivé de la Saframycine A. Nos recherches ajoutent ainsi une nouvelle démonstration de la fixation directe de la GAPDH à l'ADN modifié. Nous avons ensuite recherché par CASTing s'il existait une séquence spécifique de fixation à l'ADN de la GAPDH. Les résultats préliminaires de sélection de séquence cible montrent la présence de sites préférentiels autour d'une séquence de base GGTG (Figure 72). Ces résultats sont en



cours de validation et il est important de tester l'interaction de la GAPDH à d'autres oligonucléotides obtenus par CASTing afin de valider un éventuel consensus. Un point important est l'augmentation flagrante de fixation de la GAPDH à ces oligonucléotides alkylés par le S23906-1. Cette expérience est une nouvelle preuve qui indique que la GAPDH reconnaît non seulement la séquence, mais aussi la structure de l'ADN.

La GAPDH peut interagir sous différentes formes avec l'ADN (mono, bi ou tétramérique). Pour déterminer la nature des complexes formés en retard en gel sur les adduits S23906-1/ADN, nous avons réalisé des expériences en présence de NAD^+ , de G3P ou d'ATP. Le NAD^+ et G3P permettent de constater indirectement la liaison de la GAPDH à l'ADN alkylé par le S23906-1 via son site NAD^+ et au niveau du site de fixation du G3P. La présence d'ATP va quant à elle induire une déstabilisation de la forme tétramérique de la GAPDH. La diminution de l'interaction de la GAPDH purifiée d'érythrocytes humains ou contenues dans les extraits nucléaire de cellules HT-29 montre que cette protéine interagirait avec Smad-SBE alkylé sous forme tétramérique. L'utilisation d'ATP révèle également la fixation possible de GAPDH sous-forme mono- ou dimérique puisque les complexes les plus bas formés entre la séquence T1 et la GAPDH et visualisés lors d'expériences de retard en gel ne sont pas inhibés (Figures 77 et 78).

Il serait alors intéressant de valider la présence de structure tétra-, di- ou monomériques de la GAPDH au niveau de cet oligonucléotide et d'identifier également le site d'interaction à l'ADN de cette GAPDH puisque les complexes les plus bas observés sur les retards en gel formés entre la GAPDH et T1 ne sont pas déstabilisés en présence de NAD^+ . Pour cela il est possible d'incuber la GAPDH avec l'ADN alkylé, de dénaturer l'ADN qui n'interagit pas avec la GAPDH, de séparer et identifier la taille des complexes par western-blot. Enfin d'un point de vue plus global, il est important de vérifier l'augmentation de fixation de la GAPDH à la chromatine alkylée par le S23906-1 dans chacune des lignées testées pour valider l'augmentation d'interaction aux oligonucléotides observé dans nos expériences.

2. Mécanisme d'action du JLK1486

Le second grand axe de cette thèse a porté sur l'étude du mécanisme d'action du JLK1486 et a montré que cette molécule ne se fixe pas avec l'ADN mais à certains groupements thiols comme ceux du glutathion. Cependant, cette liaison au glutathion participe au processus de détoxification cellulaire mais ne représente pas la cible du composé

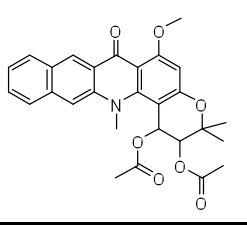
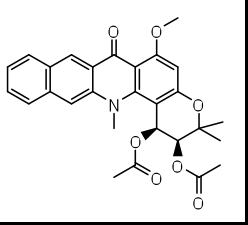
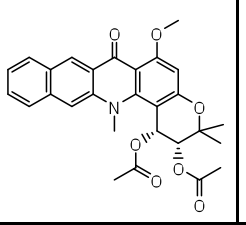
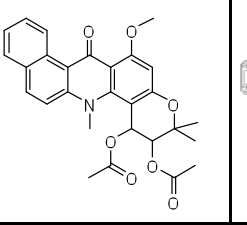
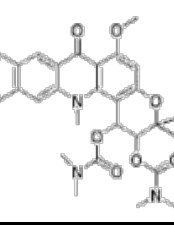
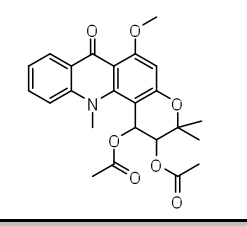
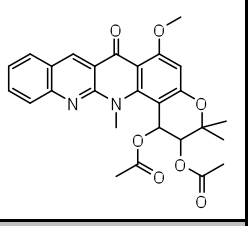
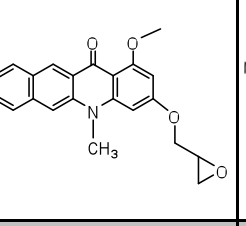
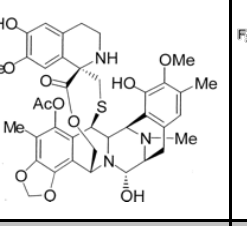
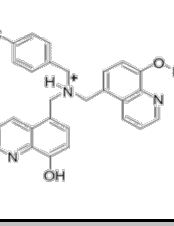
que nous avons voulu rechercher. Nous avons mis en évidence de manière indirecte par 2D-DIGE différentielle qu'elle pouvait interagir avec certaines protéines par un processus d'alkylation. Si elles sont repérées, les quantités de protéines mises en œuvre ont été trop faibles pour permettre leur identification en MALDI-TOF. Il sera important de renouveler l'expérience en multipliant le nombre de gels préparatifs ainsi que la quantité de protéines au sein de ces gels pour optimiser les possibilités d'identification des protéines cible du JLK1486.

CHAPITRE V :
Matériel et méthodes

1. Molécules, oligonucléotides et protéines utilisés

1.1. Composés

Le composé S23906-1 (PM=489 g/mol) et ses dérivés, ainsi que le composé JLK1486, sont reçus sous forme cristalline purifiée. Ils sont alors dilués dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10mM, réparti en différents aliquots qui sont conservés à -20°C. Les différents produits utilisés sont listés dans le tableau suivant.

				
S23906-1	S27589-1	S27590-1	S71344-1	S29385-1
				
S17887-1	S71507-1	S73356-1	ET-743	JLK1486
Tableau 7: Molécules utilisées lors des différentes expériences				

1.2. Oligonucléotides

Les oligonucléotides sont reçus sous forme cristalline simple brin, ils sont repris dans de l'eau mQ afin d'obtenir une concentration finale de 500 µM. Une quantité de brin « a » est ajouté à une même quantité de brin « b ». Dans le cas d'un marquage radioactif, le brin « b » est ajouté à hauteur de 1,5 fois par rapport à la quantité de brin « a ». La réaction d'hybridation des deux brins d'oligonucléotides s'effectue en plaçant la solution 10 min à 90°C puis en laissant redescendre lentement la température à 4°C. Les oligonucléotides doubles brins ou simples brins sont listés dans le tableau suivant.

N°	Nom	Séquence
1	2/In1	5' -CTATGACTCTGTCATAG
2	Smad-SBEa Smad-SBEb	5' -AGTATGTCTAGACTGA TCATACAGATCTGACT-5'
3	Biotine-Smad-SBE-a Smad-SBEb	*5' -AGTATGTCTAGACTGA TCATACAGATCTGACT-5'
4	Smad-SBEm1-a Smad-SBEm1-b	5' - AGTATGTCTAGTGCGA TCATACAGATCAGCCT-5'
5	Smad-SBEm2-a Smad-SBEm2-b	5' - AGTACGACTAGACTGA TCATGCTGATCTGACT-5'
6	Smad-SBEm3-a Smad-SBEm3-b	5' - AGTACGACTAGTGCGA TCATGCTGATCAGCCT-5'
7	XHb XHa	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT ACGTACGGACGTCAGCTGAGATC-5'
8	XHb-M1A	5' -AGCTTGCATGACTGCAGGTCGACT
9	XHb-M1B	5' -AGCTTGCATGCATGCAGGTCGACT
10	XHb-M2	5' -AGCTTGAATGCCTGCAGGTCGACT
11	XHb-M4	5' -AGCTTGCATGCCTGAAGGTCGACT
12	XHb-M5	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGTAGACT
13	XHb-M1	5' -AGCTTGCATGAATGCAGGTCGACT
14	XHb-M1A-M2	5' -AGCTTGAATGACTGCAGGTCGACT
15	XHb-M2-M4	5' -AGCTTGAATGCCTGAAGGTCGACT
16	XHb-M4-M5	5' -AGCTTGCATGCCTGAAGGTAGACT
17	XHb-M2-M5	5' -AGCTTGAATGCCTGCAGGTAGACT
18	XHb-M1B-M4	5' -AGCTTGCATGCATGAAGGTCGACT
19	XHb-M1A-M2-M4	5' -AGCTTGAATGACTGAAGGTCGACT
20	XHb-M1A-M4-M5	5' -AGCTTGCATGACTGAAGGTAGACT
21	XHb-M2-M4-M5	5' -AGCTTGAATGCCTGAAGGTAGACT
22	XHb-M1A-M2-M4-M5	5' -AGCTTGAATGACTGAAGGTAGACT
23	XHb-M1-M2-M4-M5	5' -AGCTTGAATGAATGAAGGTAGACT
24	XHb-D1	5' -AGCTTGCATG--TGCAGGTCGACT
25	XHb-D4	5' -AGCTTGCATGCCTG-AGGTCGACT
26	XHb-D5	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGT-GACT
27	XHb-D2	5' -AGCTTG-ATGCCTGCAGGTCGACT
28	XHb-AP2	5' -AGCTTG (dR) ATGCCTGCAGGTCGACT
29	XHb-AP4	5' -AGCTTGCATGCCTG (dR) AGGTCGACT
30	XHb-AP5	5' -AGCTTGCATGCCTGCAGGT (dR) GACT
31	Msx a Msx b	5' -GGCGAATTAGGAATTAGG CCGCTTAATCCTTAATCC
32	Pit-1 a Pit-1 b	5' -TGTCTTCTGAATATGAATAAGAATAA ACAGAAGGACTTATACTTATTCTTTATT-5'
33	NF-1 a NF-1 b	5' -TTTTGGATTGAAGCCAATATGATAA AAAACCTAACTTCGGTTATACTATT-5'
34	T1	5' -AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
35	T2	5' -AGGGTTAGGGTTAGGGTT
36	D5	5' -GTGGTCATGTGGTCCCGGG CACCAGTAACACCAGGGCCC-5'
37	G9	5' -CCGGTGTTTATTGACGTCA GGCCACAATAACTGCAGT-5
38	C3	5' -GGGGCTAGAGTTGGCGGTG CCCCGATCTCAACCGCCAC-5'
39	G6	5' -CGGTGCCATGGCGGAGGGGG GCCACGGTACCGCTCCCCC-5
40	G5	5' -ACGTCATGGGGTGGTACTGG TGCAGTACCCACCATGTCC-5'
41	B7	' -AGTATGCGGAGGTATGAGTT TCATACGCTCCATACTCAA-5'
42	A6	5' -GGGCTCAGCCATTAGGTATT CCCGAGTCGGTAATCCATAA-5'
43	H3	5' -TGAACACGTTTGTCTGTTTTCG ACTTGTGCAACGACAAACG-5'
44	F8	5' -TATCACGAAGTACTGGAATC ATAGTGCTTCATGACCTTAG-5
45	C9	5' -AGGCAGCCCGGCAATGGCA TCCGTCCGGCCGTTTACCGT-5'
46	A12	5' -GCAAAGGGGATAGGGTACCG CGTTTCCCCTATCCCATGGC-5'
47	A9	5' -TCGGCGGGGGCTGGGGCGG AGCCGCGCCCGGACCCGCC-5'
48	CASTing aléatoire	5' -GTAGCAGCCTCACTACA (N) ₁₆ GGAGGCTAGGCGTCAATCT

49	CASTing primer a CASTing primer b	5'-AGATTGACGCCTAGACCTCC 5'-GTAGCGACGCTCACTACA
----	--------------------------------------	--

Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés lors des différentes expériences

1.3. Protéines

1.3.1. Protéines commerciales

Les protéines pures ont toutes été achetées chez Sigma : HMG-B1 humaine (H4652), GAPDH d'érythrocyte humain (G6019), GAPDH de muscle de lapin (G2267) et GAPDH de muscle de poulet (G9263).

1.3.2. Préparation des protéines

1.3.2.1. 1.3-2-1 Expression en lysat de réticulocytes

L'expression de protéines en lysat de réticulocytes s'effectue par le kit TNT® Quick Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega). Vingt-cinq µL de lysat sont mélangés à 2 µL de tampon TNT® reaction Buffer, 1 µL de TNT® T3 RNA polymérase, 1 µL d'acides aminés à 1 mM, 2 µL d'inhibiteur de ribonucléase (Invitrogen) et 1µg du plasmide d'intérêt (vecteur réalisé selon le protocole décrit en paragraphe 2.1.2, exprimant la GAPDH-BFP). Le mélange est complété avec de l'eau sans nucléase pour un volume final de 50 µL et incubé à 30°C pendant 1H30.

Afin de vérifier l'expression des protéines d'intérêt, l'acide aminé méthionine est remplacé par la [³⁵S] méthionine (1,1MBq ; 1175Ci/mmol ; GE Healthcare) dans une manipulation contrôle. Les lysats contenant les protéines marquées sont alors déposés sur un gel de polyacrylamide (gel de concentration : 5% acrylamide/bisacrylamide 37,5 :1 ; 0,125 M Tris pH 6,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS et 0,01% Temed ; gel de séparation : 10% acrylamide/bisacrylamide 37,5 :1 0,375 M Tris pH 8,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS et 0,01% Temed). La migration s'effectue à 30 mA pendant 4H contre un tampon de migration (25 mM Tris pH 8 ; 192 mM glycine ; SDS 0,1%). Le gel est alors séché sous vide et analysé au phosphoImager.

1.3.2.2. Extraction de protéines totales

Les extraits totaux de cellules HT-29 sont utilisés dans l'expérience de 2D-DIGE. Afin de ne pas gêner le marquage des protéines par les fluorochromes ni la migration de la 1^{ère} dimension, le tampon de lyse ne doit contenir ni DTT, ni SDS. Vingt millions de cellules HT-29 sont récupérées, centrifugées à 1000 g, puis lavées par 20 mL de PBS. Le culot est repris

par 2 mL de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 140 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; 1% Triton-X100 ; 0,2 mM Na₃VO₄ ; 1 mM NaF ; 10 ng/mL aprotinine ; 10 ng/mL leupeptine ; 10 ng/mL pepstatine). Après incubation 1H à 4°C et agitation toutes les 10 min, la solution est centrifugée à 13000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré, dosé par la technique de Bradford et stocké à -80°C.

1.3.2.3. Extraction de protéines nucléaires

Quarante millions de cellules HT-29 sont récupérées, centrifugées à 1000 g, puis lavées avec 40 mL de PBS. Le culot est repris avec 5 mL de tampon A peu salin (10 mM Hepes pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 10 mM KCl ; 0,5 mM DTT). Après 15 min d'incubation à 4°C et fragilisation des membranes cytoplasmiques par pression osmotique, les membranes sont cassées par pression mécanique (aspiration-refoulement de la solution cellulaire au travers une aiguille 21G). La solution est centrifugée à 13000 g pendant 1 min à 4°C. Le surnageant contenant les membranes et les protéines cytoplasmiques est éliminé. Les culots correspondant aux fractions nucléaires sont resuspendus dans 1,5 mL de tampon B très salin (20 mM HEPES pH 7,9 ; 420 mM NaCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 0,5 mM PMSF ; 25% Glycérol) et les tubes sont placés sous agitation pendant 20 min à 4°C. La forte force ionique du tampon B permet de libérer les protéines nucléaires au travers des pores nucléaires. Les extraits nucléaires sont alors isolés par centrifugation à 13000 g pendant 10 min à 4°C puis dialysés à 4°C dans des cassettes de dialyse (Slide-A-Lyser® Dialysis Cassette, 2000 MWCO, Pierce) contre 1 L de tampon D (20 mM HEPES pH 7,9 ; 100 mM KCl ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 0,5 mM PMSF ; 20% Glycérol) en présence d'inhibiteurs de protéases (5 µg/µL de leupeptine et 5 µg/µL d'aprotinine). Après dialyse pendant une nuit, la concentration protéique est déterminée par dosage colorimétrique de Bradford. Les extraits nucléaires ainsi préparés sont aliquotés et conservés à -80°C.

1.3.2.4. Extraction fractionnée de protéines

Cette technique est employée pour étudier la localisation cellulaire de la GAPDH après traitement ou non des cellules A549 et HT-29 avec le S23906-1. Deux protocoles ont été utilisés.

Le premier consiste à séparer la fraction nucléaire de la fraction cytoplasmique (kit Nuclear/Cytosol Fraction, Biovision).

Le second protocole permet quant à lui d'isoler également les protéines associées à la chromatine. Un million de cellules sont collectées, centrifugées à 1000 g puis lavées dans 10 mL de PBS. Les cellules sont reprises dans 500 μ L de tampon FA (10 mM HEPES pH 7,9 ; 10 mM KCl ; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,34 M sucrose ; 10% glycérol ; 1 mM DTT ; 5 μ g/mL aprotine ; 5 μ g/mL leupeptine ; 0,5 μ g/mL pepstatine A ; 0,1 mM PMSF ; 0,1% Triton X-100) et incubées pendant 5 min à 4°C. La solution est ensuite centrifugée à 1300 g pendant 4 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est mis de côté. Le culot est lavé deux fois avec le tampon FA puis repris avec 200 μ L de tampon FB (3 mM EDTA ; 0,1 mM EGTA ; 1mM DTT 5 μ g/mL ; aprotine ; 5 μ g/mL leupeptine ; 0,5 μ g/mL pepstatine A ; 0,1 mM PMSF) et incubé pendant 30 min à 4°C. La solution est ensuite centrifugée à 1700 g pendant 4 min à 4°C. Le surnageant récupéré contient les protéines nucléaires. Le culot est lavé deux fois avec le tampon FB puis repris avec 300 μ L de tampon FC (62,5 mM Tris-HCl pH8 ; 2 % SDS ; 10% glycérol) avant d'être soniqué à trois reprises pendant 10 sec (à 50% d'intensité de l'appareil Vibra cell 72408, Bioblock) dans la glace. Après centrifugation à 13000 g, la concentration protéique de chacune des fractions est déterminée par dosage colorimétrique de Bradford. Les extraits nucléaires ainsi préparés sont conservés à -80°C. Enfin, le taux de contamination de la fraction nucléaire ou chromatinienne par la fraction cytoplasmique est mesuré par un dosage de l'activité β -Galactosidase dans chacune des fractions, en suivant le protocole du fournisseur (Luminescent β -galactosidase, ClonTech).

1.3.2.5. Dosage des protéines (Bradford)

Les extraits protéiques totaux sont dosés grâce au kit Biorad Protein Assay (Biorad). Une gamme étalon de BSA allant de 0 à 20 μ g/ μ L est réalisée et les échantillons protéiques (1 et 2 μ L en duplicat) sont dilués dans un volume final de 800 μ L d' H_2O . Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 200 μ L de réactif Biorad Protein Assay sont ajoutés et l'absorbance des échantillons est mesurée à 595 nm par spectrophotométrie. Les concentrations protéiques sont déterminées à partir de la gamme de concentration de BSA.

2. Approches moléculaires

2.1. Clonage

2.1.1. Construction plasmidique

2.1.1.1. Vecteur exprimant la GAPDH

Nous avons cloné l'ADNc (1088 pb) de la GAPDH-BFP ou de la GAPDH-GFP, initialement contenu dans le plasmide GAPDH-EGFP ou GAPDH-EBFP au sein du vecteur d'expression pBS_{II}KS permettant ainsi la transcription *in vivo* à partir des séquences T3 reconnues par l'ADN polymérase T3. Les nucléotides 93 à 1088 de l'insert correspondent aux nucléotides 111 à 1107 du gène de la GAPDH humaine. L'insert (ADNc) a donc été excisé et inséré dans le vecteur plasmide pBS_{II}KS puis amplifié selon le protocole suivant. Six µg du plasmide GAPDH-EGFP ou GAPDH-EBFP sont digérés par 6 unités d'enzyme *SacI* (R0156S, New England BioLabs) pendant 45min puis par 6 unités d'enzyme *KpnI* (R0142S, New England BioLabs). Deux µg de vecteur pBS_{II}KS sont en parallèle digérés avec 2 U de ces mêmes enzymes. Les vecteurs ouverts sont séparés par migration sur gel d'agarose 1 % pendant 1H à 120 V. Les bandes d'intérêt sont excisées du gel sous UV et l'ADN plasmidique est récupéré avec le kit NucleoSpin (Macherey-Nagel).

L'agarose est dissous à 50°C pendant 5 min dans 300 µL de tampon NT. La solution contenant l'ADN est placée sur une colonne munie d'un filtre capable de retenir les acides nucléiques, centrifugée 1 min à 11000 g puis lavée deux fois par 600 µl d'une solution NT3. Pour terminer, le vecteur est élué par 30 µL d'eau et récupéré dans un tube 1,5 mL par centrifugation pendant 2 min à 12000 g. Les ligations sont effectuées en utilisant 200 ng de vecteur et 66ng d'insert. Pour la ligation, le mélange vecteur/insert est incubé avec 4 unités de T4 DNA ligase (M0202T, New England BioLabs) pendant 16 h à 16°C dans son tampon spécifique (50 mM Tris-NaCl, pH 7,5 ; 10 mM MgCl₂ ; 1 mM ATP ; 10 mM DTT).

2.1.1.2. Clonage des oligonucléotides cibles de la GAPDH isolés par CAST-ing

Les oligonucléotidiques obtenus à partir de l'expérience de CAST-ing et contenant aux extrémités les sites de coupures d'*EcoRI* et de *BamHI* sont insérés dans le plasmide pBS_{II}KS pour être amplifiés et séquencés.

2.1.2. Souche bactérienne

La souche d'*Escherichia coli* *XL1-Blue strain* possède le génotype suivant : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F', *proAB*, *lacqZΔM15*, Tn10, (Tetr)]. Cette souche bactérienne est communément utilisée pour amplifier des plasmides d'intérêt. Elle est cultivée en solution dans du milieu LB (Luria Bertoni : peptone 10 g/L ; extrait sec de levure 5 g/L, NaCl 86 mM ; pH 7,5) ou étalée sur boîtes de pétri de LB gélosé (LB contenant de l'agar à 15 g/L).

2.1.3. Transformation bactérienne

L'amplification des plasmides s'effectue dans cette bactérie XL1. Un clone bactérien est placé dans 10 mL de milieu LB à 37°C sous agitation. Après 16H, les bactéries sont diluées au 1/10^{ème} et placées 4h à 37°C sous agitation (DO_{580nm} = 0,4 à 0,6). Cette incubation permet aux bactéries de reprendre leur phase de croissance exponentielle. Les amplifications bactériennes en milieu liquide s'effectuent toujours à 37°C sous agitation alors que les milieux gélosés sont placés à 37°C sans agitation. Les bactéries sont alors centrifugées à 5000 g pendant 8 min et le culot est repris dans 1 mL d'une solution de TSS (10 mL LB, 1 g PEG, MgCl₂ 90 mM, DMSO 45 mM). Cent µL de bactéries sont placées dans la glace en présence de 200 ng du produit de ligation préalablement dialysé sur membrane (Membrane Filters 0,025µm, Millipore) contre de l'eau mQ pendant 30 min, 900 µL d'une solution de TSS glucose (TSS, glucose 200 mM) sont ensuite ajoutés. Après 1H d'incubation sous agitation à 37°C, 200 ou 50 µL de la solution de culture sont étalés sur une boîte de pétri contenant le LB gélosé additionné de l'antibiotique de sélection, l'ampicilline (25 µg/mL).

2.1.4. Amplification des plasmides

Après incubation 16 h à 37°C dans une étuve, les clones bactériens transformés avec un plasmide d'intérêt sur boîte de pétri, sont cultivés dans 10 mL d'une solution de LB additionnée de l'antibiotique de sélection à la concentration appropriée. Après incubation à 37°C pendant 8H, 1 mL de bactéries est prélevé et placé dans 250 mL de milieu LB +

antibiotique. Cette solution bactérienne est incubée pendant 16 h à 37°C. Les plasmides ainsi amplifiés sont récupérés et purifiés à l'aide du kit Qiagen (Maxi prep). Brièvement, les bactéries sont récupérées par centrifugation à 5000 g pendant 8 min puis remises en suspension dans 10 mL de tampon P1. Les bactéries sont ensuite lysées dans 10 mL de tampon P2 pendant 5 min, et la réaction est stoppée par 10 mL de tampon P3. Les lysats sont filtrés à travers une seringue munie d'un filtre pour éliminer les débris bactériens. La solution ainsi obtenue est déposée sur une colonne où l'ADN plasmidique est retenu. Ces colonnes sont lavées 2 fois par 30 mL de tampon QBT. Les plasmides sont ensuite élués dans 15 mL de tampon QF puis précipités par 15 mL d'isopropanol à température ambiante puis dans 10 mL d'éthanol à 70 %. Les culots d'ADN plasmidique sont séchés et repris dans l'eau avant d'être dosés au spectrophotomètre (DO_{260nm}).

2.2. Méthodes d'étude des interactions ADN/ligand

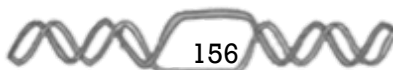
2.2.1. Etudes biophysiques

2.2.1.1. Expériences de fluorescence

Les propriétés de fluorescence du S23906-1 ont été utilisées pour vérifier son interaction à l'ADN. Cinq μM d'oligonucléotide Smad-SBE double brin sont incubés avec des concentrations croissantes en S23906-1 (1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 et 100 μM) dans un volume final de 200 μL d'acétate d'ammonium 1 mM. La lecture au spectromètre à luminescence (LS50B, Perkin Elmer) est réalisée après une nuit d'incubation à 37°C. Après excitation à 354 nm, le composé S23906-1 émet une fluorescence entre 420 et 650nm avec un pic à 500-510nm.

2.2.1.2. Test de dénaturation thermique de l'ADN

Cette technique consiste à enregistrer les variations des propriétés d'absorbance reflétant un changement conformationnel de la molécule d'ADN (effet hyperchrome). Pour cela, la densité optique (DO) à 260 nm d'une solution d'ADN soumise à une augmentation de température progressive de 20 à 100°C (augmentation de 1°C/min) est mesurée toutes les 90 secondes. Les courbes de dénaturation thermique de l'ADN sont enregistrées avec un spectrophotomètre Uvikon XL Secoman couplé à un régulateur thermique. La température de fusion d'un fragment d'ADN, ou T_m (melting temperature), correspond à la température où 50 % de l'ADN se retrouve sous forme dénaturée et 50 % sous forme double brin. La température est mesurée dans une cuve de référence à l'aide d'une sonde de température. Les



échantillons d'ADN sont placés dans 1 mL de tampon BPE (6 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7). Pour cette étude, différentes séquences XH mutées, délétées ou présentant des sites de type abasique ont été utilisées (n°7 à 30 du tableau 8). Les oligonucléotides ont une concentration finale en paires de base d'ADN de 1 µM.

2.2.2. Spectrométrie de masse, MALDI-TOF

Cette technique permet de déterminer le site d'alkylation précis du S23906-1 sur la séquence nucléotidique en épingle à cheveux de 17 pb. Cinquante µM d'oligonucléotides sont incubés avec 200 µM de S23906-1 pendant 2 ou 16H dans une solution finale d'acétate d'ammonium à 1 mM (20 µL). Dix µL de tampon (20 mM citrate d'ammonium hydrogène, 20 mM MgSO₄) contenant 2 mU de phosphodiesterase I de venin de serpent (Sigma) sont ensuite ajoutés à cette solution oligonucléotidique. L'enzyme hydrolyse les liaisons phosphodiesters de chacun des nucléotides de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Après 20 min d'incubation à 37°C, les sels sont enlevés par des colonnes de dessalage C18 Zip-Tip™ (Millipore) selon le protocole du fournisseur. Les protéines sont ensuite récupérées par 2 µL d'une solution de matrice (20 mM d'ammonium citrate ; 50% d'acétonitrile ; 7 mg/mL de 3-HPA (acide 3-hydroxypicolinique)), puis déposées sur une cible MALDI-TOF non téflonnée. Enfin les oligonucléotides sont analysés par MALDI-TOF en mode linéaire et de polarité négative (intensité du laser : 2900 ; voltage d'accélération : 20kV).

2.2.3. Méthodes radioactives

2.2.3.1. Marquage radioactif des oligonucléotides

Quarante ng d'oligonucléotide (n° 2 à 6 et 31 à 48 du tableau n° 8) simple brin sont marqués par l'incorporation sur l'extrémité 5' de γ -[³²P]-ATP (1,85 MBq; 3000Ci/mmol ; GE Healthcare). Le marquage s'effectue par l'ajout de 20 U d'enzyme T4 polynucléotide kinase (M0201S ; New England BioLabs). Après 2H d'incubation à 37°C, l'enzyme est inactivée pendant 10 min à 90°C et 60 ng d'oligonucléotides complémentaires sont ajoutés. Une fois la température redescendue lentement la température à 4°C, l'oligonucléotide double brin est purifié par migration sur gel de polyacrylamide à 10% non dénaturant (rapport acrylamide:bisacrylamide 19:1 ; 0,5% TBE ; 0,5% APS et 0,05% Temed) et séparés par une migration de 1H30 à 150 V dans une solution de TBE 1X (Invitrogen). Après autoradiographie du gel, les bandes d'intérêt sont excisées, broyées puis éluées dans un tampon TE-NaCl (10 mM Tris ; 1 mM EDTA ; 100 mM NaCl pH 8) pendant une nuit à 4°C. L'ADN radiomarqué en solution est alors séparé du gel d'acrylamide par centrifugation au



travers d'un filtre millipore de porosité de 0,45 µm de diamètre puis précipité dans l'éthanol absolu froid par centrifugation 30 min à 13500 g. L'éthanol est éliminé et le culot d'ADN est remis en suspension dans 50 µL d'eau mQ.

Dans le cadre de l'expérience de CASTing, 100 ng d'oligonucléotides simple brin aléatoires (n°48 tableau n°8) sont marqués de manière identique, mais hybridés à 300 ng de primer (n°49 tableau n°8). La polymérisation du brin complémentaire est effectuée par incorporation sur l'extrémité 3' des dNTP par 4 unités d'enzyme Klenow (11008404001 ; Roche) pendant 1H à 37°C. L'oligonucléotide double brin est ensuite purifié par migration sur gel de polyacrylamide et récupéré comme précédemment.

Le fragment d'ADN de 117 pb provenant du plasmide pBS (Stratagen) est obtenu par digestion enzymatique *EcoRI-PvuII*. Le marquage est effectué par incorporation d' α -[³²P]-dATP 1,85 MBq; 3000Ci/mmol ; GE Healthcare) au niveau du site *EcoRI* et en 3' du fragment d'ADN par 40 unités d'enzyme AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase, Finzyme, 20U/µL). Après 2H d'incubation à 37°C, 12 µL d'une solution de dATP non marqué à 100 mM sont ajoutés. L'oligonucléotide est ensuite purifié par migration 2H à 170V sur gel de polyacrylamide 10% et récupéré comme précédemment.

2.2.3.2. Digestion à la nucléase S1

La nucléase S1 est une endonucléase spécifique des ADN (ou ARN) simple brin. Cette technique permet ainsi de localiser indirectement les zones simples brin de l'ADN. Les oligonucléotides sont tout d'abord alkylés ou non par 0, 10 ou 50 µM de S23906-1 ou ses dérivés à 37°C pendant 16H dans un volume final de 20µL de cacodylate de sodium 1mM. Après précipitation à l'éthanol absolu froid, l'ADN est digéré pendant 15min à 37°C avec 4 unités de nucléase S1 (818348, Roche), dans un volume final de 5 µL de tampon spécifique (30 mM acétate de sodium ; 50 mM NaCl ; 0,1 mM ZnSO₄ ; 5% glycérol). La solution est déposée sur un gel non dénaturant à 10% (rapport acrylamide:bisacrylamide 37,5:1, TBE 1X).

2.3. Méthodes d'étude des interactions

protéine/ADN

2.3.1. Modulation de fixation de facteurs de transcription à l'ADN

Les membranes Panomics TranSignal™ Protein/DNA Arrays ont été utilisées. Elles ont été développées originellement pour comparer le taux d'expression de facteurs de transcription au sein de différentes lignées cellulaires. Cette technique permet d'effectuer un criblage large d'environ 400 facteurs de transcription. Le kit a été détourné de son utilisation initiale afin d'étudier la spécificité d'alkylation par le S23906-1 de séquences d'ADN consensus reconnues par les facteurs de transcription dans le but de déterminer les conséquences des adduits S23906-1/ADN sur la transcription. Dix µL d'un mélange d'oligonucléotides biotinylés spécifiquement reconnus par des facteurs de transcription sont incubés en absence (contrôle) ou en présence de 1 ou 5 µM de S23906-1 dans 100 µL de tampon cacodylate de sodium 1 mM. L'alkylation est réalisée à 37°C toute la nuit. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 10 µL de NaCl 5M et de 1 mL d'éthanol absolu à -20°C, suivi d'une centrifugation à 13500 g pendant 30 min à 4°C. Le culot est repris dans 20 µL de Binding Buffer 1X du kit auquel nous avons ajouté 15 µg de protéines d'extraits nucléaires de cellules HT-29. Une incubation de 30 min à 15°C permet aux facteurs de transcription contenus dans les extraits nucléaires de se lier à leurs oligonucléotides cibles respectifs. L'isolation des complexes [facteur de transcription/ADN] est réalisée à l'aide de colonnes de centrifugation qui retiennent les complexes protéine-oligonucléotide. Après lavages, les complexes sont récupérés par addition d'une solution saline (Elution Buffer). Les oligonucléotides dénaturés, en solution dans 3 mL de tampon d'hybridation du kit, sont incubés avec les membranes pendant toute une nuit à 42°C. Sur ces membranes sont greffés chacun des oligonucléotides simple brin correspondant aux séquences complémentaires des cibles des facteurs de transcription testés (kits TranSignal™/protein/DNA arrays I à V). Les membranes sont ensuite lavées et une solution de HRP (Horse Radish-Peroxidase) couplée à la streptavidine est ajoutée. Pour terminer, les membranes sont incubées dans une solution contenant le substrat de la HRP (ECL, GE Healthcare) et sont ensuite révélées par autoradiographie (films GE Healthcare). L'analyse se fait à l'aide du logiciel ImageQuant qui quantifie l'intensité de chaque spot. Le rapport d'intensité est calculé en

faisant le ratio « intensité du test avec drogue » sur « intensité du contrôle sans drogue ». Comme établi par le fournisseur, la modulation de l'interaction ADN/facteur de transcription est significative lorsque le ratio présente une valeur absolue supérieure à 1,5.

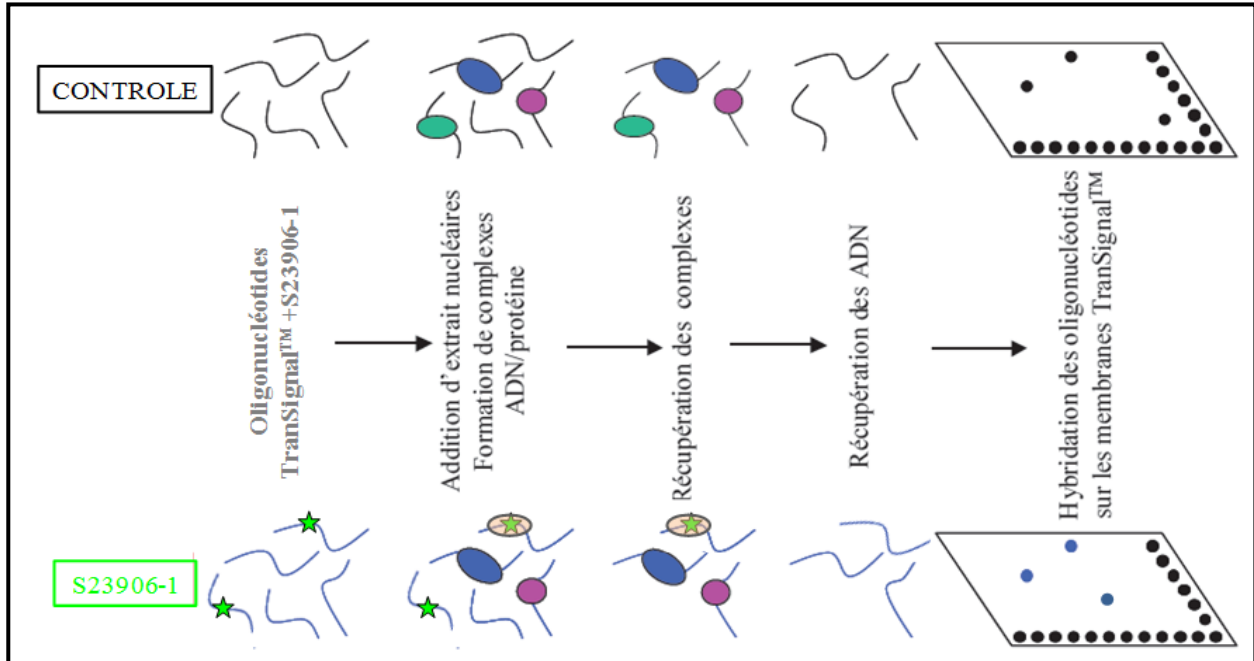


Figure 96 : TranSignal™/protein/DNA arrays (Panomics).

Les oligonucléotides biotinylés sont incubés ou non avec le S23906-1 puis des extraits nucléaires de cellules HT-29 sont ajoutés. Les complexes facteurs de transcription/ADN ainsi formés sont récupérés. Les ADN sont isolés des complexes et hybridés à leur brin complémentaire sur les membranes TranSignal™. Des billes de streptavidine couplées à la protéine HRP sont ajoutées. Une analyse densitométrique permet de déterminer les rapports d'inhibition ou d'activation de la formation des complexes ADN/facteurs de transcription par le S23906-1.

2.3.2. **Chromatographie d'affinité**

Cette technique nous permet d'isoler les protéines d'extraits nucléaires qui se fixent à l'adduit Smad-SBE/S23906-1 par rapport à Smad-SBE non alkylé. Cinquante μM d'oligonucléotide biotinylé sont incubés ou non avec 200 μM de S23906-1 dans un volume final de 200 μL d'acétate d'ammonium 1 mM. Après une nuit d'incubation à 37°C, cette solution est complétée par 2 mL de tampon de fixation (20 mM HEPES pH 7,9 ; 20 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT), puis sont injectés dans les colonnes qui contiennent des molécules de streptavidine immobilisées sur des billes de Sepharose™ High Performance (HiTrap™ Streptavidin HP, Amersham Biosciences). Puis, la colonne est lavée avec 10 mL de tampon de liaison pour enlever tout élément non fixé. Afin d'éviter la dénaturation des protéines, la chromatographie est réalisée en chambre froide. Le protocole décrit ci-dessous est réalisé en parallèle pour chacune des deux colonnes. Cinq mg d'extraits nucléaires de

cellules HT-29 dilués dans un volume final de 3 mL de tampon de fixation contenant 5 µg/mL de leupeptine et 5 µg/mL d'aprotinine sont injectés à trois reprises dans la colonne avec un débit constant de 1 mL/min. Un mL de solution protéique est ensuite incubé avec les oligonucléotides contenus dans chacune des colonnes pendant 1H en circuit fermé, grâce à une pompe péristaltique. Les protéines nucléaires non fixées sont éliminées par 10 mL de tampon de fixation, puis les protéines fixées aux oligonucléotides sont décrochées par un passage de 1,2 mL de tampon d'élution (20 mM HEPES pH 7,9 ; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT) contenant des concentrations croissantes en NaCl (50, 100, 200, 300, 500 ou 1000 mM) en circuit fermé pendant 5 minutes. Les protéines éluées sont dessalées par dialyse contre 1 L d'eau mQ à 4°C contenant 1 g de résine (AG®501-X8(D) Resin, Bio-Rad). Deux dialyses courtes précèdent une dialyse d'une nuit. Les échantillons sont alors placés 1H à -80°C, lyophilisés sur la nuit puis stockées à -80°C. Les protéines seront ensuite séparées par électrophorèse (voir partie 2.4.1).

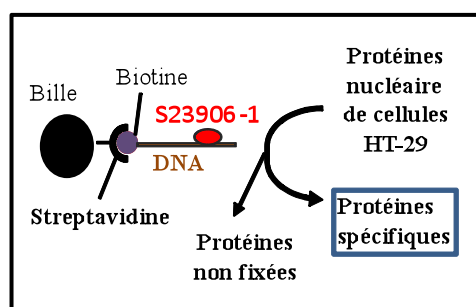


Figure 97: Chromatographie d'affinité.

Les protéines d'extraits nucléaires de cellules HT-29 sont injectées dans les colonnes de chromatographie contenant l'oligonucléotide Smad-SBE alkylé ou non par le S23906-1. Les protéines qui se fixent à l'ADN alkylé ou non sont éluées avec des concentrations croissantes en NaCl.

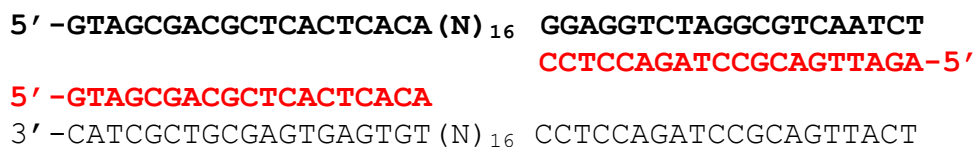
2.3.3. Retard en gel

Cette technique permet de visualiser l'interaction entre une protéine et une sonde d'acide nucléique marquée, en se basant sur la différence de mobilité sur gel de polyacrylamide d'un complexe protéine-ADN par rapport à celle de la sonde ADN libre. Les oligonucléotides radiomarqués (voir partie 2.2.3) sont incubés avec 50 µM de composé S23906-1 ou l'un de ses dérivés dans une solution finale de 50 µL d'acétate d'ammonium 1 mM. Après 16H d'incubation à 37°C, les oligonucléotides sont précipités à l'éthanol absolu froid. Les oligonucléotides sont ensuite repris avec 50 µL d'eau mQ. Deux µL de cette solution oligonucléotidique sont incubés avec un mélange comprenant 4 µL de tampon d'interaction 5X (15 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM KCl, 1,5 mM EDTA, 10% glycérol, 1,5 mM DTT), 2 µL de polyIdC à 0,6 µg/µL, 1 µL de BSA à 10 µg/µL ainsi qu'une quantité adéquat en protéine pure, d'extraits nucléaires de cellules HT-29 ou de lysat de réticulocytes (voir partie 1.3.2). Ces expériences ont également été réalisées en présence de NAD⁺ (0,1 ; 1 ; 2,5 ou 5 mM) ou de l'ATP (1 ; 2,5 ; 5 ou 10 mM), ces molécules sont alors préalablement

incubées avec les protéines pendant 30 min à 4°C, puis ajoutées au mélange. Après 30 min d'incubation, les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant à 6 % (rapport acrylamide:bisacrylamide 37,5:1, TBE 0,5X). L'électrophorèse s'effectue à 300 V pendant 3H contre un tampon TBE 0,5X. Le gel est ensuite séché et analysé au phosphoImager. Le pourcentage de complexe formé par rapport à l'ADN libre est quantifié par le logiciel Image Quant TL (GE Healthcare).

2.3.4. CASTing

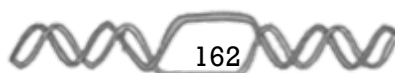
Cette technique consiste en l'utilisation d'oligonucléotides aléatoires double brin non alkylés qui sont ensuite sélectionnés pour leurs interactions avec la GAPDH pure d'érythrocytes humains via des retards sur gel (voir partie 2.3.3). Les oligonucléotides aléatoires sont incubés pendant 30 min à 4°C avec de la GAPDH dans un volume final de 20 µL de solution d'interaction contenant 300 mM de NaCl. Les solutions d'oligonucléotides non marqués sont préparées en quantité 20 fois plus importante que la quantité de solution d'oligonucléotides marqués. Puisque le pool d'oligonucléotides présente au départ une faible proportion de molécules d'ADN capables d'interagir avec la GAPDH, plusieurs cycles de sélection sont nécessaires. Une amplification par PCR des fragments isolés du complexe ADN/protéine est réalisée après chaque round de sélection. Cette PCR est possible grâce aux fragments d'ADN non aléatoires présents à l'extrémité de l'oligonucléotide double brin, qui peut alors interagir avec des amorces (rouge):



La PCR est réalisée avec les solutions du kit Platinum PCR Super Mix High Fidelity (Invitrogen) dans un volume final de 50 µL, comprenant 0,8 µM de chacun des primers. Le cycle PCR est le suivant :

- 3 min à 90°C
- 3 min à 90°C, 2min à 60°C puis 2min à 72°C (cycle répété 30 fois)
- 15 min à 72°C
- diminution de la température jusqu'à 4°C

Le cycle sélection/amplification est répété 6 fois afin d'augmenter de façon exponentielle l'abondance dans le mélange des séquences préférentielles.



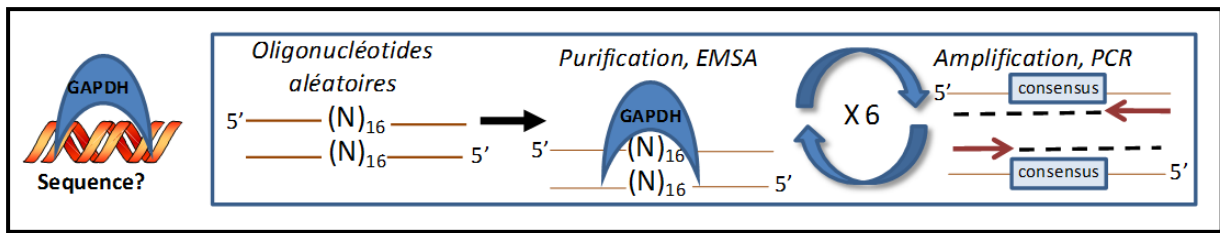


Figure 98: CASTing.

La GAPDH est incubée avec un oligonucléotide contenant des séquences aléatoires. L'oligonucléotide du complexe ADN/protéine est amplifié par PCR, pour être ensuite réincubé avec la GAPDH pure. Après 6 cycles, l'ADN est amplifié en bactérie puis séquencé.

Afin d'amplifier de manière importante la quantité d'oligonucléotide finale, ceux-ci sont insérés dans un plasmide qui se multipliera en bactérie. Pour cela, les sites de restrictions des enzymes *SacI* et *KpnI* sont ajoutées aux extrémités de l'oligonucléotide double brin par PCR. Ces oligonucléotides sont alors insérés dans un vecteur d'amplification (voir partie 2.1.1), amplifiés puis séquencés. Les séquences obtenues sont alignées manuellement ou par divers logiciels informatiques.

2.4. Analyses protéomiques

2.4.1. Electrophorèse monodimensionnelle (1D)

L'électrophorèse 1D réalisée avec le système Biorad PROTEAN II XL Cell nous permet de séparer les protéines éluées des colonnes de chromatographie. Les échantillons sont repris dans 50 µL de tampon de charge 2X (100 mM Tris HCl, pH 6,8 ; 200 mM DTT, 4% SDS, 20% glycérol et 0,2% bleu de bromophénol) et déposés sur un gel d'acrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide 37,5/1 ; gel de concentration à 5%: 0,125 M Tris pH 6,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,01% TEMED ; gel de séparation à 10%: 0,375 M Tris pH 8,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,01% TEMED). La migration s'effectue dans un tampon de migration (25 mM Tris pH 8; 192 mM glycine ; 0,1% SDS) pendant 18H à 12 mA. Les gels sont ensuite fixés et colorés au nitrate d'argent selon le protocole du fournisseur (kit ProteoSilver, Sigma). Après comparaison des échantillons contenant les protéines qui étaient fixées à l'ADN seul et ceux contenant les protéines retenues par les adduits ADN/S23906-1, les spots d'intérêt sont excisés et décolorés selon le protocole du fournisseur (kit ProteoSilver, Sigma). Deux-cent µL d'une solution de carbonate d'ammonium 0,5% / acétonitrile 50% sont déposés sur chaque spot. Les fragments de gel sont séchés au Speed-Vac puis les protéines sont hydrolysées par 10 µL d'une solution de trypsine (Promega) à 4 µg/mL dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM à pH 8,5. Cette endoprotéase hydrolyse la liaison peptidique après un acide aminé basique (lysine ou arginine) sauf si elle implique une proline.

Après une incubation de 18H à 37°C, les peptides sont extraits du gel par ajout de 25 µL puis de 10 µL d'une solution de TFA (acide trifluoroacétique) 0,1% / acétonitrile 50% pendant 30 min. La solution peptidique est séchée au Speed-Vac puis reprise par 10 µL de TFA 0,1%. Cette solution est dessalée par des colonnes de micro-dessalage µC18 Zip-Tip™ (Millipore). Les peptides sont repris avec une solution d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique à 5 mg/mL dans du TFA 0,1% / acétonitrile 50% et déposés sur la cible MALDI-TOF. L'analyse est effectuée en mode réflecteur et de polarité positive (intensité du laser : 2300 ; voltage d'accélération : 20 kV).

2.4.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

Cette technique nous a permis de séparer les protéines pures de GAPDH du commerce ainsi que les protéines contenues dans certaines éluions des colonnes de chromatographie.

2.4.2.1. Première dimension

Les protéines sont d'abord séparées selon leur point isoélectrique (pI). Elles sont reprises avec 100 µL de solution de réhydratation (7M Urée ; 2M Thiourée; 4% Chaps; 0,4% Triton X-100; Bleu de Bromophénol à 0,025%) contenant 20 mM de DTT et 0,46% d'Ampholytes 3-10 (Bio-Rad) et déposé contre une strip, dans un portoir adapté à l'appareil IEF Cell de chez Bio-Rad. Les strips (Bio-Rad) sont des gels déshydratés formés par un gradient de pH immobilisé de 3 à 10. Ils sont préalablement réhydratés de manière passive pendant 16H avec 400 µL de la solution de réhydratation. Le programme d'isoélectrofocalisation est le suivant :

- Étape 1 : 50 V en montée rapide pendant 14H
- Étape 2 : 200 V en montée rapide pendant 2H
- Étape 3 : 200 V à 1 000 V en gradient linéaire pendant 2H
- Étape 4 : 1 000 V à 8 000 V en gradient linéaire pendant 4H
- Étape 5 : 8 000 V maintenus pendant 6H

2.4.2.2. Equilibration

Afin de réduire les ponts disulfure, les strips sont ensuite placées dans 10 mL de tampon d'équilibration (68 mM de Tris pH 8,8 ; 8 M d'Urée; 2% de SDS; 40% de glycérol) contenant 1% de DTT et mise sous agitation pendant 15 min. Les cystéines sont ensuite alkylées sous agitation pendant 20 min à l'obscurité dans 10 mL de tampon d'équilibration contenant 1,6% d'iodoacétamide et 5 mg de bleu de bromophénol qui permettra le suivi de la

migration. Les strips sont rincées dans 10 mL de tampon d'électrophorèse 1X (25 mM Tris ; 200 mM glycine ; 0,1% SDS ; 5 mM thiosulfate de sodium).

2.4.2.3. Deuxième dimension

Les gels 2D forment un gradient 9-15% de polyacrylamide, ils sont coulés la veille de leur utilisation afin d'éviter la formation d'adduits d'acrylamide avec les résidus cystéines des protéines et sont stockés à 4°C. Le gradient est obtenu par mélange de deux phases :

	Phase « légère » 9%	Phase « lourde » 15%
Solution stock d'acrylamide ^a	5,2 mL	8,6 mL
Tampon d'électrophorèse 4X	4,4 mL	4,4 mL
SDS 10%	177,5 µL	177,5 µL
Glycérol	-	4,8 mL
Eau Ultra-Pure	8 mL	-
Temed	10,4 µL	8,9 µL
APS	99,6 µL	66,6 µL
^a 40% acrylamide + 30% piperazine di-Acrylamide		

Tableau 9 : Composition des différentes phases du gradient de polyacrylamide.

Une fois la strip déposée, un gel d'agarose « low melting » à 1% dans du tampon d'électrophorèse 1X est coulé pour la maintenir. Deux µL de marqueur de poids moléculaire (Invitrogen™) sont déposés. Les gels 2D sont placés dans les cuves PROTEAN II XL Cell pour une migration dans du tampon d'électrophorèse 1X pendant 18H à 12 mA à 10°C. Les gels sont fixés et colorés de manière identique aux gels 1D.

2.4.3. Electrophorèse 2D-DIGE, marquage à saturation

Cette technique a été mise au point dans le but d'identifier indirectement les protéines cibles du composé JLK1486 qui présente la capacité d'interagir avec les groupements thiols. Dix µg de protéines de lysat de cellules HT-29 (voir partie 1.3.2) sont incubées ou non avec 100 µM de JLK1486 dans une solution finale de 50 µL d'acétate d'ammonium 1 mM. Après 2H d'incubation à l'obscurité, chaque pool de 10 µg de protéines (alkylées ou non par le JLK1486) est divisé en deux et marqué avec chacun des fluorochromes du kit de 2D-DIGE au niveau de toutes les cystéines des protéines (25-8009-83 ; 25-8009-84 ; 29-9366-83, GE Healthcare) de la manière suivante :

- 5 µg protéines incubées avec le JLK + 4 nmol de **Cy5**
- 5 µg protéines incubées avec le JLK + 4 nmol de **Cy3**
- 5 µg protéines non incubées avec le JLK + 4 nmol de **Cy5**
- 5 µg protéines non incubées avec le JLK + 4 nmol de **Cy3**

Le marquage est effectué pendant 30 min à l'obscurité à 37°C. Puis les protéines incubées avec le JLK1486 sont mélangées avec les protéines sans JLK1486 marquées avec un fluorochrome différent, comme indiqué ci-dessous :

- 5 µg avec JLK Cy5 + 5 µg sans JLK Cy3

- 5 µg avec JLK Cy3 + 5 µg sans JLK Cy5

Les protéines sont immédiatement reprises dans 100 µL de solution de réhydratation (contenant ampholytes et DTT) pour stopper la réaction puis celles-ci sont déposées sur une strip 3-10 ou 4-7. Le protocole utilisé pour l'électrophorèse 2D de ces gels dit « analytiques » est détaillé dans la partie électrophorèse 2D, cependant l'expérience est réalisée à l'obscurité. Les gels sont également en gradient 9-15% d'acrylamide mais nous avons utilisé également des gels pré-coulés de gradient 8-16% (161-1453, Biorad). Après migration, les gels sont scannés avec un Ettan-DIGE Imager (GE Healthcare). Les différences d'intensité de fluorescence entre les protéines incubées et non incubées avec le JLK1486 sont quantifiées par le logiciel SameSpot (Progenesis).

En parallèle, des gels d'électrophorèse 2D classiques, dit « préparatifs » sont réalisés avec 250 µg de protéines totales de cellules HT-29 non incubées avec le JLK1486. Ces gels sont colorés au nitrate d'argent. Les spots d'intérêt observés préalablement en fluorescence sur les gels « analytiques » sont excisés et analysés par MALDI-TOF.

2.4.4. Western-blotting

Cette expérience est réalisée avec le système Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad). Les protéines sont reprises dans du tampon de charge 2X (100 mM Tris HCl, pH 6,8 ; 200 mM DTT, 4% SDS, 20% glycérol et 0,2 % bleu de bromophénol) et dénaturées 3 min à 100°C. Dix µg d'échantillon sont déposés sur un gel d'acrylamide (gel de concentration : 5% acrylamide/bisacrylamide 37,5/1 ; 0,125 M Tris, pH 6,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,01% TEMED ; gel de séparation : 10% acrylamide/bisacrylamide 37,5/1 ; 0,375 M Tris ; pH 8,8 ; 0,1% SDS ; 0,1% APS ; 0,01% TEMED) et la migration s'effectue dans le tampon de migration (25 mM Tris pH 8 ; 192 mM glycine ; 0,1% SDS) pendant 2H à 110 V. Après migration, le gel est transféré sur une membrane PVDF (Polyvinylidene fluoride) (GE Healthcare) pendant 90 min à 100 V dans un tampon de transfert à 4°C (192 mM glycine ; 25 mM Tris, pH 8,3 ; 0,1% SDS ; 20% méthanol). La membrane est ensuite saturée pendant 1H dans 10 mL de solution de saturation (10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 150 mM NaCl ; 0,1% Tween 20 ; 1% lait) afin de limiter les interactions non spécifiques de l'anticorps sur la membrane.

Puis elle est incubée avec 10 mL de tampon T (10 mM Tris-HCl pH 8.0 ; 150 mM NaCl ; 0,1% Tween 20 ; 0,1% lait) contenant l'anticorps primaire pendant 1H sous agitation. Deux lavages successifs de 10 min sous agitation sont réalisés avec 10 mL de tampon T, puis la membrane est incubée avec 10 mL de tampon T contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) pendant 1H sous agitation.

Les anticorps utilisés dans les diverses expériences sont regroupés dans le tableau suivant :

Anticorps primaire	Fournisseur	Dilution	Anticorps secondaire couplés HRP	Fournisseur	Dilution
GAPDH (37KDa) Mouse	tebu-bio (sc-47524)	1/300	Goat anti-mouse IgG-HRP	tebu-bio (sc2031)	1/20.000
Topoisomérase (110KDa) Goat	tébu-bio (sc5342)	1/300	Donkey anti-goat IgG-HRP	tebu-bio (sc2020)	1/20.000
Histone H3 (17KDa) Rabbit	Cell Signaling (05-928)	1/5000	Goat anti-rabbit IgG-HRP	tebu-bio (sc2004)	1/35.000
HSC-70 (70KDa) Mouse	tébu-bio (sc7298)	1/300	Goat anti-mouse IgG	tebu-bio (sc2031)	1/20.000
HMG-1 (24KDa) Goat	tébu-bio (sc26351)	1/300	Donkey anti-goat IgG-HRP	tebu-bio (sc2020)	1/20.000

Tableau 10 : Anticorps utilisés lors des différentes expériences de western-blot et de retard en gel.

Trois lavages successifs de 10 min dans 10 mL de tampon T sont à nouveau réalisés avant un 4^{ème} lavage dans 10 mL de tampon T ne contenant pas de Tween.

L'activité HRP couplée aux anticorps retenus par les protéines d'intérêt sur la membrane sont révélées par chimioluminescence avec le kit ECL (GE Healthcare) sur des films radiographiques (GE Healthcare).

3. Approches cellulaires

3.1. Culture cellulaire

Les cellules de carcinome de colon humain HT-29 (ATCC: HTB-38) ou d'adénocarcinome de poumon humain A549 (ATCC: CCL-185) sont cultivées dans un milieu DMEM-glutaMAX (Invitrogen) auquel sont classiquement ajoutés 10% de SVF (sérum de veau foetal) et 1% de mélange pénicilline-streptomycine (pénicilline G : 10000 U/mL, streptomycine 10 µg/mL, Invitrogen). Les cellules sont maintenues en culture à 37°C avec 5% de CO₂ dans une étuve sous atmosphère humide (90%). L'ensemencement s'effectue dans une flasque T150 (150 cm²) tous les 2 à 3 jours à raison de 200.000 cellules/mL.

3.2. Microscopie de fluorescence

3.2.1. Localisation de la GAPDH exogène en temps réel

3.2.1.1. Localisation subcellulaire de la GAPDH avant traitement

Le plasmide exprimant la GAPDH-GFP nous a été généreusement fourni par le Dr Jean-Luc Dreyer de l'Université de Fribourg. La transfection d'un million de cellules A549 par 20 µg de plasmide est réalisée avec un kit d'électroporation (kit T, programme X-001, Amaxa). 60.000 cellules électroporées sont tout d'abordensemencés dans chacun des puits de lames compartimentées (8 puits, LabTech, VWR), dans 500 µL de milieu DMEM-glutaMAX sans SVF ni antibiotiques. Le milieu de culture est changé 6H après la transfection. Après une incubation de 18H supplémentaires, les cellules sont fixées pendant 5 min par 200 µL de méthanol 100% à -20°C. Les cellules sont perméabilisées avec 0,2% de Triton X-100 dans du PBS (Invitrogen) pendant 10 min à température ambiante, puis incubées pendant 30 min avec 3% de BSA dans du PBS. Puis les cellules sont lavées 5 min par 500 µL de PBS. Enfin, la préparation est scellée entre lame et lamelle dans 8 µL/puits d'une solution de «Vectashield+DAPI» (VECTOR). Le DAPI ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole, λ_{exc} 359 nm et λ_{em} 461 nm) se fixe sur les régions riches en paires de bases AT de l'ADN et marque ainsi le noyau d'une fluorescence bleue. Les lames sont observées au microscope droit à fluorescence LEICA® et les images sont captées par le logiciel Qflu.

3.2.1.2. Localisation subcellulaire de la GAPDH après traitement (Time Lapse)

Les cellules sont électroporées selon le même protocole que précédemment, puis 60.000 cellules sontensemencées sur une boîte de pétri contenant un fond en verre (glass base Dish, VWR) de 1 cm de diamètre. Après une incubation de 24H, les cellules sont traitées directement dans l'enclos du Time Lapse (ASMDW, LEICA®), avec 1,5µM de S23906-1 dans 500 µL de milieu. Une photographie est prise toutes les 30 secondes pendant 6H.

3.2.2. Localisation de la GAPDH endogène (Confocal)

Les images en microscopie à fluorescence classique ont une perte de résolution due à l'excitation des fluorochromes se situant hors du plan focal. En effet les fluorochromes sont excités par le laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) sur toute l'épaisseur de la préparation, ce qui se traduit par une image contaminée par un bruit de fond. L'objectif de la microscopie confocale à balayage laser est d'éliminer la lumière provenant des plans défocalisés qui parasitent le plan focal.

Les cellules HT-29 et A549 sontensemencées dans 500µL de milieu de culture sur des lames compartimentées en 8 puits (LabTech, VWR) à la densité de 60.000 cellules/mL. Après 24H d'incubation, les cellules sont traitées avec 250 µL d'une solution contenant soit:

- 1 mM de H₂O₂ pendant 1H puis remplacé par du milieu neuf pendant 24H
- 750 µM de glutathion nitrosylé pendant 24H
- 2,5 ou 5 µM de S23906-1 pendant 24H

Les cellules sont ensuite lavées par 500µL de PBS puis fixées pendant 5min par 200 µL de méthanol 100% à -20°C. Les cellules sont perméabilisées avec 0,2% de Triton X-100 dans du PBS pendant 10 min à température ambiante, puis incubées pendant 30 min avec 3% de BSA dans du PBS. Les cellules sont lavées pendant 5 min par 500 µL de PBS. Elles sont ensuite incubées avec 200 µL d'anticorps primaire dirigé contre la GAPDH dilué au 1/100^{ème} dans du PBS. Après 1H d'incubation, les cellules sont lavées deux fois 5min au PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-mouse AlexaFluor 488 (λ_{exc} 495, λ_{em} 519, Invitrogen) dilué au 1/2000^{ème}. Après 1H d'incubation, les cellules sont de nouveau lavées deux fois 5min avec du PBS. Enfin, la préparation est scellée entre lame et lamelle dans 8 µL/puit d'une solution de «Vectashield+DAPI» (VECTOR). Les lames sont observées au microscope confocal Zeiss (LSM710) permettant de visualiser la localisation de la GAPDH après traitement au S23906-1. Les images sont captées par le logiciel ZEN 2009.

3.3. Transfection transitoire d'un siRNA

3.3.1. Mise au point du protocole

Le siRNA (small interference RNA) se fixe spécifiquement à l'ARNm cible et permet ainsi d'éteindre l'expression du gène. Chacune des expériences réalisées avec le siRNA dirigé contre la GAPDH (Ambion) est contrôlée par l'utilisation d'un siRNA dit « Négatif » (Ambion) correspondant à une séquence de siRNA aléatoire ne ciblant aucun ARNm. La mise

au point du protocole a été réalisée sur des plaques 24 puits (voir le protocole 2.3.2). Pour cela, une gamme de 0 ; 25 ; 50 ; 100 ou 250 nM de siRNA ainsi qu'une gamme de 1 ; 2 ou 3 μ L de lipofectamine par puits a été évaluée. Les quantités de 50 nM de siRNA et 2 μ L de lipofectamine ont été retenues suite à des tests de transfection d'un siRNA fluorescent (44-2524, Invitrogen) en cytométrie en flux puis d'une validation de la diminution du taux d'expression en western-blot. Les quantités ont ensuite été adaptées pour les expériences de survie cellulaire.

3.3.2. Préparation des cellules pour l'étude du cycle cellulaire et contrôle du taux d'expression de la GAPDH

Cette expérience est réalisée dans le but d'observer l'effet d'une inhibition de l'expression de la GAPDH sur l'activité cytotoxique du S23906-1, mais également pour contrôler la diminution d'expression de la GAPDH lors des expériences de MTS ou encore de cycle cellulaire. Dans ce cas, les cellules ont été lysées et le niveau d'expression de la protéine identifié en western-blot. Les cellules HT29 sontensemencées dans 500 μ L de milieu à la densité de 12.000 cellules/mL et incubées pendant 24H à 37°C dans des plaques 24 puits. Le mélange siRNA/lipofectamine/OptiMEM est ensuite préparé de la manière suivante : un volume de lipofectamine (2 μ L final/puits) est tout d'abord « activée » dans 40 μ L de milieu OptiMEM (Invitrogen) pendant 10 min. Le siRNA est ensuite ajouté à cette solution à une concentration final/puits de 25 ou 50 nM pendant 20 min dans 80 μ L final d'OptiMEM. Enfin 40 μ L de DMEM-glutaMAX sans SVF ni antibiotique sont ajoutés. Cette solution finale est déposée dans chacun des puits. Après 6H d'incubation à 37°C, cette solution est remplacée par 100 μ L de milieu neuf (contenant SVF et antibiotiques) pendant 42H supplémentaires. Les cellules sont alors prêtes à être lysées pour la validation de l'inactivation en western-blot ou incubées avec des concentrations croissantes en S23906-1 pour des mesures de survie cellulaire.

3.3.3. Préparation des cellules pour le test de survie

Les cellules HT29 sontensemencées dans 100 μ L de milieu à la densité de 15.000 cellules/mL et incubées pendant 24H à 37°C dans des plaques 96 puits. La Lipofectamine RNAi Max[®] (Invitrogen) à 0,5 μ L final/puits est « activée » dans 10 μ L de milieu OptiMEM (Invitrogen) pendant 10 min, le siRNA est ensuite ajouté à cette solution à une concentration final/puits équivalente à 25 ou 50 nM et incubé pendant 20 min supplémentaires dans 20 μ L

final d'OptiMEM. Enfin, 10 μ L de DMEM-glutaMAX sans SVF ni antibiotique sont ajoutés. Cette solution finale est déposée dans chacun des puits pour 6H d'incubation à 37°C. Celle-ci est remplacée par 100 μ L de milieu (contenant SVF et antibiotiques) pendant 42H supplémentaires.

3.4. Cytométrie en flux

Les cellules HT29 pré-incubées avec le siRNA sont traitées avec des concentrations croissantes en S23906-1 (0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ou 10 μ M) pendant 48H à 37°C. Les cellules adhérentes sont récupérées par trypsinisation et centrifugées 5 min à 1200 g. Le surnageant est éliminé alors que le culot cellulaire est lavé avec 1 mL de PBS et centrifugé de nouveau à 1200 g pendant 5 min. Les cellules sont fixées dans une solution d'éthanol à 70% à froid pendant 24 heures à -20°C. Après centrifugation 5 min à 1200 g et lavage avec 1 mL de PBS à froid, les cellules sont marquées par une solution d'iodure de propidium à 50 μ g/mL (Interchim, France), additionnée de RNase à 100 μ g/mL (Sigma-Aldrich) dans du PBS pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'analyse de la distribution du cycle cellulaire est déterminée sur un cytomètre en flux Becton Dickinson FACScan (BD biosciences) en utilisant le logiciel CellQuestPro (BD biosciences). Les phases du cycle cellulaire sont quantifiées par le logiciel WinMDI.

3.5. Evaluation de la survie cellulaire (MTS)

Ce test colorimétrique est basé sur la capacité des mitochondries fonctionnelles (à travers la NADP-déshydrogénase active) à réduire le MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium)) en cristaux de formazan détectables en spectrométrie visible. Il permet alors d'évaluer les effets des traitements étudiés sur la croissance globale d'une population cellulaire donnée, en déterminant le nombre de cellules vivantes restant au sein de la culture cellulaire analysée. Ce test permet d'évaluer la concentration pour laquelle 50% des cellules sont vivantes après traitement (IC_{50}). Après traitement au siRNA, les 100 μ L de milieu de culture sont remplacés par 100 μ L de milieu contenant des quantités croissantes en S23906-1. Après 72H d'incubation à 37°C, le réactif MTS (CellTiter 96® Aqueous, Promega) est ajouté à raison de 20 μ L par puits et incubé à 37°C pendant 1H. Sa réduction entraîne un changement de couleur de la molécule qui passe du jaune au pourpre. Le pourcentage de cellules vivantes est déterminé par la lecture de l'absorbance à 492 nm des différents échantillons traités ou non. L'absorbance à cette

longueur d'onde est maximale lorsque le dérivé tétrazolium est réduit (couleur pourpre).
L'IC₅₀ est calculée à partir des courbes de survie par le logiciel SoftMax Pro Software.

BIBLIOGRAPHIE

1. Paz, M.M., T.A. Das, and M. Tomasz, *Mitomycin C linked to DNA minor groove binding agents: synthesis, reductive activation, DNA binding and cross-linking properties and in vitro antitumor activity*. Bioorg Med Chem, 1999. **7**(12): p. 2713-26.
2. Hoeijmakers, J.H., *DNA damage, aging, and cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(15): p. 1475-85.
3. Reed, J.C. and K.R. Ely, *Degrading liaisons: Siah structure revealed*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(1): p. 8-10.
4. Batthyany, C., et al., *Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20450-63.
5. Hara, M.R., et al., *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 665-74.
6. David-Cordonnier, M.H., et al., *Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double-stranded DNA induces helix opening and the formation of single-stranded DNA: unique consequences of a novel DNA-bonding mechanism*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(1): p. 71-80.
7. Abbotts, R. and S. Madhusudan, *Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer*. Cancer Treat Rev.
8. Song, S. and T. Finkel, *GAPDH and the search for alternative energy*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 869-70.
9. Neidle, S. and D.E. Thurston, *Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 285-96.
10. Kartalou, M., L.D. Samson, and J.M. Essigmann, *Cisplatin adducts inhibit 1,N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase*. Biochemistry, 2000. **39**(27): p. 8032-8.
11. Sarkaria, J.N., et al., *Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(10): p. 2900-8.
12. Bayir, H. and V.E. Kagan, *Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory*. Crit Care, 2008. **12**(1): p. 206.
13. Noll, D.M., T.M. Mason, and P.S. Miller, *Formation and repair of interstrand cross-links in DNA*. Chem Rev, 2006. **106**(2): p. 277-301.
14. David-Cordonnier, M.H., et al., *Alkylation of guanine in DNA by S23906-1, a novel potent antitumor compound derived from the plant alkaloid acronycine*. Biochemistry, 2002. **41**(31): p. 9911-20.
15. Simmons, T.L., et al., *Marine natural products as anticancer drugs*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(2): p. 333-42.
16. David-Cordonnier, M.H., et al., *A transesterification reaction is implicated in the covalent binding of benzo[b]acronycine anticancer agents with DNA and glutathion*. Bioorg Med Chem, 2004. **12**(1): p. 23-9.
17. Tarze, A., et al., *GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization*. Oncogene, 2007. **26**(18): p. 2606-20.
18. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
19. Faguet, G.B., *The war on cancer*. Springer Editors, 2005.
20. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(6): p. 473-80.
21. Goodman, L.S., Wintrobe, M.M., Dameshek, W. et al., *Use of methyl-bis-B-chloroethylamine hydrochloride for hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia, and certain allied and miscellaneous disorders*. JAMA, 1946. **132**: p. 126-132.
22. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. J Nat Prod, 2007. **70**(3): p. 461-77.
23. Thurston, D.E., *Chemistry and Pharmacology of anticancer drugs*. CRC Press, 2007.
24. Karacetin, D., et al., *Capecitabine and oxaliplatin (XELOX) as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer*. J BUON, 2009. **14**(4): p. 605-8.
25. Knockaert, M., P. Greengard, and L. Meijer, *Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(9): p. 417-25.
26. Ruetz, S., et al., *Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003. **3**(1): p. 1-14.
27. Binaschi, M., F. Zunino, and G. Capranico, *Mechanism of action of DNA topoisomerase inhibitors*. Stem Cells, 1995. **13**(4): p. 369-79.
28. Galm, U., et al., *Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin*. Chem Rev, 2005. **105**(2): p. 739-58.
29. Pullman, A. and B. Pullman, *Molecular electrostatic potential of the nucleic acids*. Q Rev Biophys, 1981. **14**(3): p. 289-380.
30. McHugh, P.J., et al., *Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(16): p. 3259-66.
31. Jagetia, G.C., et al., *The evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain herbal formulations in vitro: a preliminary study*. Phytother Res, 2004. **18**(7): p. 561-5.
32. Shukla, P.K., Mishra, P.C., Suhai, S., *Reactions of DNA bases with the anti-cancer nitrogen mustard mechlorethamine: A quantum chemical study* Chemical Physics Letters 2007. **449**: p. 323-328.

33. Millard, J.T., et al., *Sequence preferences of DNA interstrand crosslinking agents: quantitation of interstrand crosslink locations in DNA duplex fragments containing multiple crosslinkable sites*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(8): p. 1885-91.
34. Rink, S.M. and P.B. Hopkins, *A mechlorethamine-induced DNA interstrand cross-link bends duplex DNA*. *Biochemistry*, 1995. **34**(4): p. 1439-45.
35. Mishina, Y., E.M. Duguid, and C. He, *Direct reversal of DNA alkylation damage*. *Chem Rev*, 2006. **106**(2): p. 215-32.
36. Bodell, W.J., *DNA alkylation products formed by 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea as molecular dosimeters of therapeutic response*. *J Neurooncol*, 2009. **91**(3): p. 257-64.
37. Eisenbrand, G., et al., *DNA adducts and DNA damage by antineoplastic and carcinogenic N-nitrosocompounds*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1986. **112**(3): p. 196-204.
38. Ali-Osman, F., A. Rairkar, and P. Young, *Formation and repair of 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cisplatin induced total genomic DNA interstrand crosslinks in human glioma cells*. *Cancer Biochem Biophys*, 1995. **14**(4): p. 231-41.
39. Wiencke, J.K. and J. Wiemels, *Genotoxicity of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU)*. *Mutat Res*, 1995. **339**(2): p. 91-119.
40. Ma, L.C., et al., *Transcriptional repression of O6-methylguanine DNA methyltransferase gene rendering cells hypersensitive to N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea in camptothecin-resistant cells*. *Mol Pharmacol*, 2008. **74**(2): p. 517-26.
41. Yu, Y.L., et al., *Extended O6-methylguanine methyltransferase promoter hypermethylation following n-butylidenephthalide combined with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) on inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth*. *J Agric Food Chem*. **58**(3): p. 1630-8.
42. Kokkinakis, D.M., et al., *Sensitization of pancreatic tumor xenografts to carmustine and temozolomide by inactivation of their O6-Methylguanine-DNA methyltransferase with O6-benzylguanine or O6-benzyl-2'-deoxyguanosine*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(10 Pt 1): p. 3801-7.
43. Wilds, C.J., F. Xu, and A.M. Noronha, *Synthesis and characterization of DNA containing an N1-2'-deoxyinosine-ethyl-N3-thymidine interstrand cross-link: a structural mimic of the cross-link formed by 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea*. *Chem Res Toxicol*, 2008. **21**(3): p. 686-95.
44. Roberts, J.J. and F. Friedlos, *Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair in mammalian cells: relationship to toxicity*. *Pharmacol Ther*, 1987. **34**(2): p. 215-46.
45. Wang, D. and S.J. Lippard, *Cellular processing of platinum anticancer drugs*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(4): p. 307-20.
46. Boudvillain, M., et al., *Intrastrand cross-links are not formed in the reaction between transplatin and native DNA: relation with the clinical inefficiency of transplatin*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(13): p. 2381-8.
47. Bellon, S.F. and S.J. Lippard, *Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, trans-diamminedichloroplatinum(II) and cis-[Pt(NH₃)₂(N₃-cytosine)Cl]⁺*. *Biophys Chem*, 1990. **35**(2-3): p. 179-88.
48. Takahara, P.M., et al., *Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin*. *Nature*, 1995. **377**(6550): p. 649-52.
49. Gelasco, A. and S.J. Lippard, *NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin*. *Biochemistry*, 1998. **37**(26): p. 9230-9.
50. Yang, D., et al., *Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin-cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis*. *Biochemistry*, 1995. **34**(39): p. 12912-20.
51. Fouchet, M.H., et al., *Synthesis and characterization of a d(ApG) platinated nonanucleotide duplex*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **182**(2): p. 555-60.
52. Malinge, J.M., C. Perez, and M. Leng, *Base sequence-independent distortions induced by interstrand cross-links in cis-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(19): p. 3834-9.
53. Coste, F., et al., *Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(8): p. 1837-46.
54. Huang, H., et al., *Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link*. *Science*, 1995. **270**(5243): p. 1842-5.
55. Zamble, D.B., et al., *Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease*. *Biochemistry*, 1996. **35**(31): p. 10004-13.
56. Dabholkar, M., et al., *Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(2): p. 703-8.
57. Yu, J.J., et al., *Alternative splicing of ERCC1 and cisplatin-DNA adduct repair in human tumor cell lines*. *Int J Mol Med*, 1998. **1**(3): p. 617-20.
58. Li, Q., et al., *Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(2A): p. 645-52.
59. Moggs, J.G., et al., *Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(3): p. 480-91.
60. Pil, P.M. and S.J. Lippard, *Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 234-7.

61. Huang, J.C., et al., *HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10394-8.
62. Fink, D., et al., *The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance*. Cancer Res, 1996. **56**(21): p. 4881-6.
63. Hoffmann, J.S., et al., *In vitro bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase beta and human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase is highly mutagenic*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15386-92.
64. Vaisman, A., et al., *The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3579-85.
65. Lin, X., H.K. Kim, and S.B. Howell, *The role of DNA mismatch repair in cisplatin mutagenicity*. J Inorg Biochem, 1999. **77**(1-2): p. 89-93.
66. Raymond, E., et al., *Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(3): p. 227-35.
67. Dronkert, M.L. and R. Kanaar, *Repair of DNA interstrand cross-links*. Mutat Res, 2001. **486**(4): p. 217-47.
68. Caponigro, F., et al., *Phase I dose-escalation study of brostallicin, a minor groove binder, in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors*. Cancer Chemother Pharmacol. **66**(2): p. 389-94.
69. Lorusso, D., et al., *Brostallicin (PNU-166196), a new minor groove DNA binder: preclinical and clinical activity*. Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(12): p. 1939-46.
70. Geroni, C., et al., *Brostallicin, a novel anticancer agent whose activity is enhanced upon binding to glutathione*. Cancer Res, 2002. **62**(8): p. 2332-6.
71. Swenson, D.H., et al., *Mechanism of interaction of CC-1065 (NSC 298223) with DNA*. Cancer Res, 1982. **42**(7): p. 2821-8.
72. Hurley, L.H., *DNA and its associated processes as targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 188-200.
73. Gregson, S.J., et al., *Design, synthesis, and evaluation of a novel pyrrolobenzodiazepine DNA-interactive agent with highly efficient cross-linking ability and potent cytotoxicity*. J Med Chem, 2001. **44**(5): p. 737-48.
74. Hartley, J.A., et al., *SJG-136 (NSC 694501), a novel rationally designed DNA minor groove interstrand cross-linking agent with potent and broad spectrum antitumor activity: part 1: cellular pharmacology, in vitro and initial in vivo antitumor activity*. Cancer Res, 2004. **64**(18): p. 6693-9.
75. Clingen, P.H., et al., *The XPF-ERCC1 endonuclease and homologous recombination contribute to the repair of minor groove DNA interstrand crosslinks in mammalian cells produced by the pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimer SJG-136*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(10): p. 3283-91.
76. Rahman, K.M., et al., *The pyrrolobenzodiazepine dimer SJG-136 forms sequence-dependent intrastrand DNA cross-links and monoalkylated adducts in addition to interstrand cross-links*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(38): p. 13756-66.
77. Hochhauser, D., et al., *Phase I study of sequence-selective minor groove DNA binding agent SJG-136 in patients with advanced solid tumors*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 2140-7.
78. Janjigian, Y.Y., et al., *A phase I trial of SJG-136 (NSC#694501) in advanced solid tumors*. Cancer Chemother Pharmacol. **65**(5): p. 833-8.
79. David-Cordonnier, M.H., et al., *DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin*. Chem Biol, 2005. **12**(11): p. 1201-10.
80. Friedman, D., et al., *Ecteinascidin-743 inhibits activated but not constitutive transcription*. Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3377-81.
81. Jin, S., et al., *Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6775-9.
82. Bonfanti, M., et al., *Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA*. Anticancer Drug Des, 1999. **14**(3): p. 179-86.
83. Minuzzo, M., et al., *Selective effects of the anticancer drug Yondelis (ET-743) on cell-cycle promoters*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(5): p. 1496-503.
84. Martinez, N., et al., *Transcriptional signature of Ecteinascidin 743 (Yondelis, Trabectedin) in human sarcoma cells explanted from chemo-naive patients*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(5): p. 814-23.
85. Takebayashi, Y., et al., *Ecteinascidin 743 induces protein-linked DNA breaks in human colon carcinoma HCT116 cells and is cytotoxic independently of topoisomerase I expression*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(1): p. 185-91.
86. Erba, E., et al., *Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action*. Eur J Cancer, 2001. **37**(1): p. 97-105.
87. Herrero, A.B., et al., *Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8155-62.

Bibliographie

88. Soares, D.G., et al., *Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13062-7.
89. Helleday, T., et al., *DNA repair pathways as targets for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(3): p. 193-204.
90. Hughes, G.K., Lahey, F.N. and Price, J.R., *Alkaloids of the Australian Rutaceae*. Nature (Lond.), 1948. **162**: p. 223-224.
91. Macdonald, P.L., Robertson, A.V. , *The structure of acronycine*. Aust. J. Chem., 1966. **19**: p. 275-281.
92. Gougoutas, J.Z.K., B. A. , *crystal and molecular structure of bromodihydroacronycine*. Acta Crystallogr., 1970. **B26**: p. 853-859.
93. Svoboda, G.H., Poore, G.A., Simpson, P.J. and Boder, G.B., *Alkaloids of Acronychia baueri. Isolation of the alkaloids and study of the antitumor and other biological properties of acronycine*. J. Pharmacol. Sci., 1966. **55**: p. 758-768.
94. Scarffe, J.H., A.R. Beaumont, and D. Crowther, *Phase I-II evaluation of acronine in patients with multiple myeloma*. Cancer Treat Rep, 1983. **67**(1): p. 93-4.
95. Dunn, B.P., P.W. Gout, and C.T. Beer, *Effects of the antineoplastic alkaloid acronycine on nucleoside uptake and incorporation into nucleic acids by cultured L5178Y cells*. Cancer Res, 1973. **33**(10): p. 2310-9.
96. Tan, P. and N. Auersperg, *Effects of the antineoplastic alkaloid acronycine on the ultrastructure and growth patterns of cultured cells*. Cancer Res, 1973. **33**(10): p. 2320-9.
97. Low, R.S. and N. Auersperg, *Effects of acronycine and of cytochalasin B on the division of rat leukemia cells*. Exp Cell Res, 1981. **131**(1): p. 15-24.
98. Kessel, D., *Effects of acronycine on cell-surface properties of murine leukemia cells*. Biochem Pharmacol, 1977. **26**(11): p. 1077-81.
99. Gout, P.W., B.P. Dunn, and C.T. Beer, *Effects of acronycine on nucleic acid synthesis and population growth in mammalian tumor cell cultures*. J Cell Physiol, 1971. **78**(1): p. 127-38.
100. Dorr, R.T., Liddil, J.D., *Development of a parental formulation of the antitumor agent acronycine*. J. Drug. Dev., 1988. **1**: p. 31-39.
101. Shieh, H.L., J.M. Pezzuto, and G.A. Cordell, *Evaluation of the cytotoxic mechanisms mediated by the broad-spectrum antitumor alkaloid acronycine and selected semisynthetic derivatives*. Chem Biol Interact, 1992. **81**(1-2): p. 35-55.
102. Brum-Bousquet, M., et al., *Acronycine epoxide: a new acridone alkaloid from several Sarcomelicope species*. Planta Med, 1988. **54**(5): p. 470-1.
103. Tillequin, F., *[New antitumor agents in the acronycine series]*. Ann Pharm Fr, 2002. **60**(4): p. 246-52.
104. Costes, N., et al., *Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of benzo[b]pyrano[3, 2-h]acridin-7-one analogues of acronycine*. J Med Chem, 2000. **43**(12): p. 2395-402.
105. Nguyen, Q.C., et al., *Acronycine derivatives: a promising series of anticancer agents*. Anticancer Agents Med Chem, 2009. **9**(7): p. 804-15.
106. Michel, S., T. Gaslonde, and F. Tillequin, *Benzo[b]acronycine derivatives: a novel class of antitumor agents*. Eur J Med Chem, 2004. **39**(8): p. 649-55.
107. Do, Q., et al., *Structure-activity relationships in the acronycine and benzo[b]acronycine series: role of the pyran ring*. Eur J Med Chem, 2008. **43**(12): p. 2677-87.
108. Léonce, S., Perez, V., Lambel, S., Burbridge, M., Tillequin, F., Koch, F., Pfeiffer, B., Pierré, A., and Atassi, G., *Cytotoxic and cell cycle effect of S23906-1, a new acronycine derivative*. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 2000. **41**: p. 601.
109. Guilbaud, N., et al., *Marked antitumor activity of a new potent acronycine derivative in orthotopic models of human solid tumors*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(8): p. 2573-80.
110. Leonce, S., et al., *Induction of cyclin E and inhibition of DNA synthesis by the novel acronycine derivative S23906-1 precede the irreversible arrest of tumor cells in S phase leading to apoptosis*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(6): p. 1383-91.
111. Kluza, J., et al., *Induction of apoptosis in HL-60 leukemia and B16 melanoma cells by the acronycine derivative S23906-1*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(8): p. 1443-52.
112. Leonce, S., et al., *Generation of replication-dependent double-strand breaks by the novel N2-G-alkylator S23906-1*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7203-10.
113. Cahuzac, N., et al., *An unusual DNA binding compound, S23906, induces mitotic catastrophe in cultured human cells*. Cancer Lett. **289**(2): p. 178-87.
114. David-Cordonnier, M.H., et al., *Covalent binding to glutathione of the DNA-alkylating antitumor agent, S23906-1*. Eur J Biochem, 2003. **270**(13): p. 2848-59.
115. David-Cordonnier, M.H., et al., *Design of novel antitumor DNA alkylating agents: the benzacronycine series*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2004. **4**(2): p. 83-92.
116. Chen, M., A.M. Hough, and T.S. Lawrence, *The role of p53 in gemcitabine-mediated cytotoxicity and radiosensitization*. Cancer Chemother Pharmacol, 2000. **45**(5): p. 369-74.
117. Graham, F.L. and G.F. Whitmore, *Studies in mouse L-cells on the incorporation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine into DNA and on inhibition of DNA polymerase by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate*. Cancer Res, 1970. **30**(11): p. 2636-44.

Bibliographie

118. Tran-Thi, H.A., et al., *Synthesis and cytotoxic activity of pyranocarbazole analogues of ellipticine and acronycine*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2004. **52**(5): p. 540-5.
119. Thi Mai, H.D., et al., *Structure-activity relationships and mechanism of action of antitumor benzo[b]pyrano[3,2-h]acridin-7-one acronycine analogues*. J Med Chem, 2003. **46**(14): p. 3072-82.
120. Bosco, E.E., et al., *RB signaling prevents replication-dependent DNA double-strand breaks following genotoxic insult*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(1): p. 25-34.
121. Pourquier, P., et al., *Induction of topoisomerase I cleavage complexes by 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) in vitro and in ara-C-treated cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1885-90.
122. Hoeijmakers, J.H., *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 366-74.
123. Damia, G., et al., *Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways*. Int J Cancer, 2001. **92**(4): p. 583-8.
124. D'Incalci, M. and C.M. Galmardini, *A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action*. Mol Cancer Ther. **9**(8): p. 2157-63.
125. Rocca, C.J., et al., *The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: implications for recognition and repair of antitumor alkylators*. Biochem Pharmacol. **80**(3): p. 335-43.
126. Wang, Q., et al., *Bcl2 negatively regulates DNA double-strand-break repair through a nonhomologous end-joining pathway*. Mol Cell, 2008. **29**(4): p. 488-98.
127. Sirover, M.A., *New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1432**(2): p. 159-84.
128. Bruns, G.A.P., Gerald P.S., *Human glyceraldehyde-3-dehydrogenase in man-rodent somatic cell hybrids*. Sciences, 1976. **192**: p. 54-56.
129. Hanauer, A. and J.L. Mandel, *The glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase gene family: structure of a human cDNA and of an X chromosome linked pseudogene; amazing complexity of the gene family in mouse*. EMBO J, 1984. **3**(11): p. 2627-33.
130. Fort, P., et al., *Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(5): p. 1431-42.
131. Piechaczyk, M., et al., *Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(18): p. 6951-63.
132. Welch, J.E., et al., *Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells*. J Androl, 2000. **21**(2): p. 328-38.
133. Meyer-Siegler, K., et al., *Proliferative dependent regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in human cells*. Carcinogenesis, 1992. **13**(11): p. 2127-32.
134. Mansur, N.R., et al., *Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(4): p. 993-8.
135. Franch, H.A., et al., *A mechanism regulating proteolysis of specific proteins during renal tubular cell growth*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19126-31.
136. Epner, D.E. and D.S. Coffey, *There are multiple forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in prostate cancer cells and normal prostate tissue*. Prostate, 1996. **28**(6): p. 372-8.
137. Ishitani, R. and D.M. Chuang, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9937-41.
138. Ishitani, R., et al., *An antisense oligodeoxynucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase blocks age-induced apoptosis of mature cerebrocortical neurons in culture*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(1): p. 447-54.
139. Ishitani, R., et al., *Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture*. J Neurochem, 1996. **66**(3): p. 928-35.
140. Ishitani, R., et al., *Overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in low K⁺-induced apoptosis but not necrosis of cultured cerebellar granule cells*. Mol Pharmacol, 1997. **51**(4): p. 542-50.
141. Tajima, H., et al., *Over-expression of GAPDH induces apoptosis in COS-7 cells transfected with cloned GAPDH cDNAs*. Neuroreport, 1999. **10**(10): p. 2029-33.
142. Shashidharan, P., et al., *Nuclear translocation of GAPDH-GFP fusion protein during apoptosis*. Neuroreport, 1999. **10**(5): p. 1149-53.
143. Tsuchiya, K., et al., *Disclosure of a pro-apoptotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: anti-dementia drugs depress its activation in apoptosis*. Life Sci, 2004. **74**(26): p. 3245-58.
144. Chen, R.W., et al., *Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53*. J Neurosci, 1999. **19**(21): p. 9654-62.
145. Carlile, G.W., et al., *Reduced apoptosis after nerve growth factor and serum withdrawal: conversion of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to a dimer*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(1): p. 2-12.
146. Graven, K.K., et al., *Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia*. J Biol Chem, 1994. **269**(39): p. 24446-53.

Bibliographie

147. Graven, K.K., et al., *Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1447**(2-3): p. 208-18.
148. Said, H.M., et al., *Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions in - vitro*. *BMC Res Notes*, 2009. **2**: p. 8.
149. Desprez, P.Y., D. Poujol, and S. Saez, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH)2D3)*. *Cancer Lett*, 1992. **64**(3): p. 219-24.
150. Hansen, C.N., et al., *Expression of CPEB, GAPDH and U6snRNA in cervical and ovarian tissue during cancer development*. *APMIS*, 2009. **117**(1): p. 53-9.
151. Nahlik, K.W., et al., *Modulation of GAPDH expression and cellular localization after vaccinia virus infection of human adherent monocytes*. *Acta Biochim Pol*, 2003. **50**(3): p. 667-76.
152. Alexander, M.C., et al., *Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(14): p. 5092-6.
153. Alexander-Bridges, M., et al., *Multiple insulin-responsive elements regulate transcription of the GAPDH gene*. *Adv Enzyme Regul*, 1992. **32**: p. 149-59.
154. Claeysens, S., et al., *Amino acid control of the human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene transcription in hepatocyte*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **285**(5): p. G840-9.
155. Kim, C.I., et al., *Nuclear translocation and overexpression of GAPDH by the hyper-pressure in retinal ganglion cell*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(4): p. 1237-43.
156. Brattelid, T., et al., *Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies*. *BMC Mol Biol*. **11**: p. 22.
157. Biesecker, G., et al., *Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus*. *Nature*, 1977. **266**(5600): p. 328-33.
158. Rossmann, M.G., et al., *Letter: Molecular symmetry axes and subunit interfaces in certain dehydrogenases*. *J Mol Biol*, 1973. **76**(4): p. 533-7.
159. Rao, S.T. and M.G. Rossmann, *Comparison of super-secondary structures in proteins*. *J Mol Biol*, 1973. **76**(2): p. 241-56.
160. Ismail, S.A. and H.W. Park, *Structural analysis of human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005. **61**(Pt 11): p. 1508-13.
161. Soukri, A., et al., *Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis*. *Biochemistry*, 1989. **28**(6): p. 2586-92.
162. Sirover, M.A., *New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells*. *J Cell Biochem*, 2005. **95**(1): p. 45-52.
163. Cane, D.E. and J.K. Sohng, *Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone. 2. Identification of the site of alkylation by tetrahydropentalenolactone*. *Biochemistry*, 1994. **33**(21): p. 6524-30.
164. Frohlich, K.U., et al., *Pentalenolactone-insensitive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Streptomyces arenae is closely related to GAPDH from thermostable eubacteria and plant chloroplasts*. *Arch Microbiol*, 1996. **165**(3): p. 179-86.
165. Pavao, F., et al., *Structure of Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution*. *FEBS Lett*, 2002. **520**(1-3): p. 13-7.
166. Seo, J., et al., *Strategy for comprehensive identification of post-translational modifications in cellular proteins, including low abundant modifications: application to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *J Proteome Res*, 2008. **7**(2): p. 587-602.
167. Reiss, N., et al., *Phosphatidylserine directs differential phosphorylation of actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein kinase C: possible implications for regulation of actin polymerization*. *Biochem Mol Biol Int*, 1996. **40**(6): p. 1191-200.
168. Reiss, N., H. Kanety, and J. Schlessinger, *Five enzymes of the glycolytic pathway serve as substrates for purified epidermal-growth-factor-receptor kinase*. *Biochem J*, 1986. **239**(3): p. 691-7.
169. Ashmarina, L.I., et al., *Phosphorylation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II*. *FEBS Lett*, 1988. **231**(2): p. 413-6.
170. Puder, M. and R.J. Soberman, *Glutathione conjugates recognize the Rossmann fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10936-40.
171. Brodie, A.E. and D.J. Reed, *Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. **148**(1): p. 120-5.
172. Schuppe-Koistinen, I., et al., *S-thiolation of human endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase after hydrogen peroxide treatment*. *Eur J Biochem*, 1994. **221**(3): p. 1033-7.
173. Shenton, D. and C.M. Grant, *Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 2003. **374**(Pt 2): p. 513-9.
174. Stamler, J.S., et al., *S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(1): p. 444-8.
175. Hara, M.R., M.B. Cascio, and A. Sawa, *GAPDH as a sensor of NO stress*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(5): p. 502-9.

Bibliographie

176. Hara, M.R. and S.H. Snyder, *Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade*. Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(4-6): p. 527-38.
177. Hess, D.T., et al., *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 150-66.
178. Du, X., et al., *Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1049-57.
179. Devalaraja-Narashimha, K. and B.J. Padanilam, *PARP-1 inhibits glycolysis in ischemic kidneys*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(1): p. 95-103.
180. Ishii, T., et al., *Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Biochemistry, 2003. **42**(12): p. 3474-80.
181. Feng, Z., et al., *Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells*. Biochemistry, 2003. **42**(25): p. 7848-54.
182. Tsuchiya, Y., et al., *Degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase triggered by 4-hydroxy-2-nonenal and 4-hydroxy-2-hexenal*. Arch Biochem Biophys, 2005. **438**(2): p. 217-22.
183. Ganapathy-Kanniappan, S., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death*. Anticancer Res, 2009. **29**(12): p. 4909-18.
184. Yamaji, R., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the extracellular space inhibits cell spreading*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(3): p. 261-71.
185. Robbins, A.R., R.D. Ward, and C. Oliver, *A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells*. J Cell Biol, 1995. **130**(5): p. 1093-104.
186. Nakamura, T., et al., *HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(2): p. 858-64.
187. Raje, C.I., et al., *The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor*. J Biol Chem, 2007. **282**(5): p. 3252-61.
188. Bryksin, A.V. and P.P. Laktionov, *Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum*. Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(6): p. 619-25.
189. Tisdale, E.J., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3334-41.
190. Tisdale, E.J., F. Azizi, and C.R. Artalejo, *Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C{iota} to associate with microtubules and to recruit dynein*. J Biol Chem, 2009. **284**(9): p. 5876-84.
191. Maruyama, W., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is translocated into nuclei through Golgi apparatus during apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in human dopaminergic SH-SY5Y cells*. Neurosci Lett, 2002. **321**(1-2): p. 29-32.
192. Colell, A., et al., *GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation*. Cell, 2007. **129**(5): p. 983-97.
193. Kawamoto, R.M. and A.H. Caswell, *Autophosphorylation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes*. Biochemistry, 1986. **25**(3): p. 657-61.
194. Duclos-Vallee, J.C., et al., *Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity*. J Gen Virol, 1998. **79** (Pt 7): p. 1665-70.
195. Morigasaki, S., et al., *Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade*. Mol Cell, 2008. **30**(1): p. 108-13.
196. Rodriguez-Pascual, F., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(23): p. 7139-55.
197. Mukhopadhyay, R., et al., *The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(7): p. 324-31.
198. De, B.P., et al., *Specific interaction in vitro and in vivo of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and LA protein with cis-acting RNAs of human parainfluenza virus type 3*. J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24728-35.
199. Yang, S.H., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interaction with 3' ends of Japanese encephalitis virus RNA and colocalization with the viral NS5 protein*. J Biomed Sci, 2009. **16**: p. 40.
200. Schultz, D.E., C.C. Hardin, and S.M. Lemon, *Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14134-42.
201. Zang, W.Q., et al., *Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a cellular protein that binds to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element*. Virology, 1998. **248**(1): p. 46-52.
202. Yi, M., D.E. Schultz, and S.M. Lemon, *Functional significance of the interaction of hepatitis A virus RNA with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): opposing effects of GAPDH and*

- polypyrimidine tract binding protein on internal ribosome entry site function.* J Virol, 2000. **74**(14): p. 6459-68.
203. Singh, R. and M.R. Green, *Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.* Science, 1993. **259**(5093): p. 365-8.
204. Nagy, E. and W.F. Rigby, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold).* J Biol Chem, 1995. **270**(6): p. 2755-63.
205. Lipton, S.A., et al., *A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds.* Nature, 1993. **364**(6438): p. 626-32.
206. Benhar, M. and J.S. Stamler, *A central role for S-nitrosylation in apoptosis.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 645-6.
207. Du, Z.X., et al., *Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated death of thyroid cancer cells.* Endocrinology, 2007. **148**(9): p. 4352-61.
208. Ortiz-Ortiz, M.A., et al., *Paraquat exposure induces nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the activation of the nitric oxide-GAPDH-Siah cell death cascade.* Toxicol Sci. **116**(2): p. 614-22.
209. Ventura, M., et al., *Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated by acetylation.* Int J Biochem Cell Biol.
210. Linares, L.K., et al., *Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(3): p. 331-8.
211. Park, J., et al., *O-GlcNAcylation disrupts glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homo-tetramer formation and mediates its nuclear translocation.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1794**(2): p. 254-62.
212. Yang, W.H., et al., *NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(45): p. 17345-50.
213. Dastoor, Z. and J.L. Dreyer, *Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress.* J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 9): p. 1643-53.
214. Saunders, P.A., E. Chalecka-Franaszek, and D.M. Chuang, *Subcellular distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cerebellar granule cells undergoing cytosine arabinoside-induced apoptosis.* J Neurochem, 1997. **69**(5): p. 1820-8.
215. Kragten, E., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the putative target of the antiapoptotic compounds CGP 3466 and R-(-)-deprenyl.* J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5821-8.
216. Fukuhara, Y., et al., *GAPDH knockdown rescues mesencephalic dopaminergic neurons from MPP+ - induced apoptosis.* Neuroreport, 2001. **12**(9): p. 2049-52.
217. Sharma, S.K., E.C. Carlson, and M. Ebadi, *Neuroprotective actions of Selegiline in inhibiting 1-methyl, 4-phenyl, pyridinium ion (MPP+)-induced apoptosis in SK-N-SH neurons.* J Neurocytol, 2003. **32**(4): p. 329-43.
218. Maruyama, W., et al., *Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol.* J Neurochem, 2001. **78**(4): p. 727-35.
219. Barbini, L., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase exerts different biologic activities in apoptotic and proliferating hepatocytes according to its subcellular localization.* Mol Cell Biochem, 2007. **300**(1-2): p. 19-28.
220. Saunders, P.A., R.W. Chen, and D.M. Chuang, *Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms during neuronal apoptosis.* J Neurochem, 1999. **72**(3): p. 925-32.
221. Xing, C., et al., *Identification of GAPDH as a protein target of the saframycin antiproliferative agents.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 5862-6.
222. Kodama, R., et al., *Nuclear localization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is not involved in the initiation of apoptosis induced by 1-Methyl-4-phenyl-pyridium iodide (MPP+).* Genes Cells, 2005. **10**(12): p. 1211-9.
223. Sundararaj, K.P., et al., *Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.* J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 6152-62.
224. Tatton, N.A., *Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease.* Exp Neurol, 2000. **166**(1): p. 29-43.
225. Tatton, W.G., et al., *(-)-Deprenyl reduces PC12 cell apoptosis by inducing new protein synthesis.* J Neurochem, 1994. **63**(4): p. 1572-5.
226. Wadia, J.S., et al., *Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-deprenyl.* J Neurosci, 1998. **18**(3): p. 932-47.
227. Bae, B.I., et al., *Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3405-9.
228. Hara, M.R., et al., *Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3887-9.
229. Ishitani, R., et al., *Nuclear localization of overexpressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured cerebellar neurons undergoing apoptosis.* Mol Pharmacol, 1998. **53**(4): p. 701-7.

230. Sen, N., et al., *GOSPEL: a neuroprotective protein that binds to GAPDH upon S-nitrosylation*. *Neuron*, 2009. **63**(1): p. 81-91.
231. Meyer-Siegler, K., et al., *A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(19): p. 8460-4.
232. Azam, S., et al., *Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 30632-41.
233. Zheng, L., R.G. Roeder, and Y. Luo, *S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component*. *Cell*, 2003. **114**(2): p. 255-66.
234. Demarse, N.A., et al., *Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation*. *J Mol Biol*, 2009. **394**(4): p. 789-803.
235. Schmitz, H.D., *Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion*. *Eur J Cell Biol*, 2001. **80**(6): p. 419-27.
236. Brown, V.M., et al., *A novel CRML-mediated nuclear export signal governs nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase following genotoxic stress*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(7): p. 5984-92.
237. Hwang, N.R., et al., *Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions*. *Biochem J*, 2009. **423**(2): p. 253-64.
238. Grosse, F., et al., *Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase-alpha-primase complex*. *Eur J Biochem*, 1986. **160**(3): p. 459-67.
239. Segil, N., S.B. Roberts, and N. Heintz, *Mitotic phosphorylation of the Oct-1 homeodomain and regulation of Oct-1 DNA binding activity*. *Science*, 1991. **254**(5039): p. 1814-6.
240. Dai, R.P., et al., *Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD⁺/NADH redox status*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(40): p. 26894-901.
241. Mitsuzawa, H., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin associate with RNA polymerase II and interact with its Rpb7 subunit*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(1): p. 48-52.
242. Carlile, G.W., W.G. Tatton, and K.L. Borden, *Demonstration of a RNA-dependent nuclear interaction between the promyelocytic leukaemia protein and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *Biochem J*, 1998. **335** (Pt 3): p. 691-6.
243. Wang, J., et al., *Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions*. *J Cell Biol*, 2004. **164**(4): p. 515-26.
244. Kim, S., J. Lee, and J. Kim, *Regulation of oncogenic transcription factor hTAF(II)68-TEC activity by human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. *Biochem J*, 2007. **404**(2): p. 197-206.
245. Morgeneegg, G., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a nonhistone protein and a possible activator of transcription in neurons*. *J Neurochem*, 1986. **47**(1): p. 54-62.
246. Sen, N., et al., *Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(7): p. 866-73.
247. Lill, N.L., et al., *Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators*. *Nature*, 1997. **387**(6635): p. 823-7.
248. Vollberg, T.M., B.L. Cool, and M.A. Sirover, *Biosynthesis of the human base excision repair enzyme uracil-DNA glycosylase*. *Cancer Res*, 1987. **47**(1): p. 123-8.
249. Caradonna, S., et al., *Affinity purification and comparative analysis of two distinct human uracil-DNA glycosylases*. *Exp Cell Res*, 1996. **222**(2): p. 345-59.
250. Vartanian, A., et al., *Opposite effects of cell differentiation and apoptosis on Ap3A/Ap4A ratio in human cell cultures*. *FEBS Lett*, 1997. **415**(2): p. 160-2.
251. Baxi, M.D. and J.K. Vishwanatha, *Uracil DNA-glycosylase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an Ap4A binding protein*. *Biochemistry*, 1995. **34**(30): p. 9700-7.
252. Krynetski, E.Y., et al., *A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanylated DNA*. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(2): p. 367-74.
253. Krynetski, E.Y., et al., *A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues*. *Cancer Res*, 2003. **63**(1): p. 100-6.
254. Arutyunova, E.I., et al., *Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **307**(3): p. 547-52.
255. Holtgreffe, S., et al., *Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications*. *Physiol Plant*, 2008. **133**(2): p. 211-28.
256. Dennehy, M.K., et al., *Cytosolic and nuclear protein targets of thiol-reactive electrophiles*. *Chem Res Toxicol*, 2006. **19**(1): p. 20-9.
257. Loecken, E.M. and F.P. Guengerich, *Reactions of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase sulfhydryl groups with bis-electrophiles produce DNA-protein cross-links but not mutations*. *Chem Res Toxicol*, 2008. **21**(2): p. 453-8.
258. Plowright, A.T., S.E. Schaus, and A.G. Myers, *Transcriptional response pathways in a yeast strain sensitive to saframycin a and a more potent analog: evidence for a common basis of activity*. *Chem Biol*, 2002. **9**(5): p. 607-18.

259. group, T.d.c.a.c.t.r., *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N. Eng. J. Med., 1993. **329**: p. 977-986.
260. Beisswenger, P.J., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1637**(1): p. 98-106.
261. Lee, H.J., et al., *Methylglyoxal can modify GAPDH activity and structure*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1043**: p. 135-45.
262. Carujo, S., et al., *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity*. Oncogene, 2006. **25**(29): p. 4033-42.
263. Cumming, R.C. and D. Schubert, *Amyloid-beta induces disulfide bonding and aggregation of GAPDH in Alzheimer's disease*. FASEB J, 2005. **19**(14): p. 2060-2.
264. Burke, J.R., et al., *Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 347-50.
265. Koshy, B., et al., *Spinocerebellar ataxia type-1 and spinobulbar muscular atrophy gene products interact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(9): p. 1311-8.
266. Sunaga, K., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is over-expressed during apoptotic death of neuronal cultures and is recognized by a monoclonal antibody against amyloid plaques from Alzheimer's brain*. Neurosci Lett, 1995. **200**(2): p. 133-6.
267. Tamaoka, A., et al., *Antibodies to amyloid beta protein (A beta) crossreact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. Neurobiol Aging, 1996. **17**(3): p. 405-14.
268. Schulze, H., et al., *Rat brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein*. J Neurochem, 1993. **60**(5): p. 1915-22.
269. Butterfield, D.A., S.S. Hardas, and M.L. Lange, *Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration*. J Alzheimers Dis. **20**(2): p. 369-93.
270. Oyama, R., H. Yamamoto, and K. Titani, *Glutamine synthetase, hemoglobin alpha-chain, and macrophage migration inhibitory factor binding to amyloid beta-protein: their identification in rat brain by a novel affinity chromatography and in Alzheimer's disease brain by immunoprecipitation*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1479**(1-2): p. 91-102.
271. Naletova, I., et al., *Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(12): p. 2052-8.
272. Wang, Q., et al., *Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein*. FASEB J, 2005. **19**(7): p. 869-71.
273. Tatton, W.G., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling*. J Neural Transm Suppl, 2000(60): p. 77-100.
274. Boutefnouchet, S., et al., *Synthesis, cytotoxic activity, and mechanism of action of furo[2,3-c]acridin-6-one and benzo[b]furo[3,2-h]acridin-6-one analogues of psorospermin and acronycine*. J Med Chem, 2008. **51**(22): p. 7287-97.
275. Ikuta, S., Takagi, K., Bruce Wallace, R., Itakura, K., *Dissociation kinetics of 19base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatch base pairs*. Nucleic acid research, 1987. **15**(2): p. 797-811.
276. Tibanyenda, N., et al., *The effect of single base-pair mismatches on the duplex stability of d(T-A-T-T-A-A-T-A-T-C-A-A-G-T-T-G) . d(C-A-A-C-T-T-G-A-T-A-T-T-A-A-T-A)*. Eur J Biochem, 1984. **139**(1): p. 19-27.
277. Asai, A., et al., *Characterization of a duocarmycin-DNA adduct-recognizing protein in cancer cells*. Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5417-20.
278. Budiman, M.E., U. Bierbach, and R.W. Alexander, *DNA minor groove adducts formed by a platinum-acridine conjugate inhibit association of tata-binding protein with its cognate sequence*. Biochemistry, 2005. **44**(33): p. 11262-8.
279. Pivonkova, H., et al., *Recognition of cisplatin-damaged DNA by p53 protein: critical role of the p53 C-terminal domain*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(2): p. 477-84.
280. Peixoto, P., et al., *Direct inhibition of the DNA-binding activity of POU transcription factors Pit-1 and Brn-3 by selective binding of a phenyl-furan-benzimidazole dication*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(10): p. 3341-53.
281. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
282. Ross, S., et al., *Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription*. EMBO J, 2006. **25**(19): p. 4490-502.
283. Ramjaun, A.R., et al., *Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis*. Oncogene, 2007. **26**(7): p. 970-81.
284. Pardali, K., et al., *Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21 (Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29244-56.
285. Qiu, P., X.H. Feng, and L. Li, *Interaction of Smad3 and SRF-associated complex mediates TGF-beta1 signals to regulate SM22 transcription during myofibroblast differentiation*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(12): p. 1407-20.

Bibliographie

286. Lee, H.J., et al., *SRF is a nuclear repressor of Smad3-mediated TGF-beta signaling*. *Oncogene*, 2007. **26**(2): p. 173-85.
287. Binato, R., et al., *SMAD 8 binding to mice Msx1 basal promoter is required for transcriptional activation*. *Biochem J*, 2006. **393**(Pt 1): p. 141-50.
288. Pholnukulkit, P., K. Sonoyama, and J. Kawabata, *Activin A induces phosphorylation of Smad2 but not complex formation of Smad2 with Smad4 in human colon cancer cell line HT-29*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003. **67**(9): p. 2042-4.
289. Bustin, M. and R. Reeves, *High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1996. **54**: p. 35-100.
290. Grosschedl, R., K. Giese, and J. Pagel, *HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures*. *Trends Genet*, 1994. **10**(3): p. 94-100.
291. Reeves, R. and J.E. Adair, *Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair*. *DNA Repair (Amst)*, 2005. **4**(8): p. 926-38.
292. Reddy, M.C., J. Christensen, and K.M. Vasquez, *Interplay between human high mobility group protein 1 and replication protein A on psoralen-cross-linked DNA*. *Biochemistry*, 2005. **44**(11): p. 4188-95.
293. Lange, S.S. and K.M. Vasquez, *HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic*. *Mol Carcinog*, 2009. **48**(7): p. 571-80.
294. Hughes, E.N., B.N. Engelsberg, and P.C. Billings, *Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(19): p. 13520-7.
295. Malina, J., et al., *Recognition of major DNA adducts of enantiomeric cisplatin analogs by HMG box proteins and nucleotide excision repair of these adducts*. *Chem Biol*, 2002. **9**(5): p. 629-38.
296. Lange, S.S., M.C. Reddy, and K.M. Vasquez, *Human HMGB1 directly facilitates interactions between nucleotide excision repair proteins on triplex-directed psoralen interstrand crosslinks*. *DNA Repair (Amst)*, 2009. **8**(7): p. 865-72.
297. Liu, Y., R. Prasad, and S.H. Wilson, *HMGB1: roles in base excision repair and related function*. *Biochim Biophys Acta*. **1799**(1-2): p. 119-30.
298. Stros, M., et al., *HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(9): p. 7157-64.
299. Nagaki, S., et al., *Non-histone chromosomal proteins HMGB1 and 2 enhance ligation reaction of DNA double-strand breaks*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **246**(1): p. 137-41.
300. Stros, M., D. Cherny, and T.M. Jovin, *HMGB1 protein stimulates DNA end joining by promoting association of DNA molecules via their ends*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(13): p. 4088-97.
301. Yuan, F., et al., *Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(20): p. 20935-40.
302. Genschel, J. and P. Modrich, *Functions of MutLalpha, replication protein A (RPA), and HMGB1 in 5'-directed mismatch repair*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(32): p. 21536-44.
303. Ge, H. and R.G. Roeder, *The high mobility group protein HMGB1 can reversibly inhibit class II gene transcription by interaction with the TATA-binding protein*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(25): p. 17136-40.
304. Imamura, T., et al., *Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(10): p. 7534-40.
305. Zappavigna, V., et al., *HMGB1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation*. *EMBO J*, 1996. **15**(18): p. 4981-91.
306. Depauw, S., et al., *Influence of the stereoisomeric position of the reactive acetate groups of the benzo[b]acronycine derivative S23906-1 on its DNA alkylation, helix-opening, cytotoxic, and antitumor activities*. *Mol Pharmacol*, 2009. **76**(6): p. 1172-85.
307. David-Cordonnier, M.H., et al., *The DNA binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures*. *Biochemistry*, 1998. **37**(17): p. 6065-76.
308. Phadke, M.S., et al., *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase depletion induces cell cycle arrest and resistance to antimetabolites in human carcinoma cell lines*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **331**(1): p. 77-86.
309. Moret, V., et al., *Discovery of a new family of bis-8-hydroxyquinoline substituted benzylamines with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis, structure-activity relationship, and action mechanism studies*. *Eur J Med Chem*, 2009. **44**(2): p. 558-67.
310. Zhai, S., et al., *Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells*. *J Biol Inorg Chem*. **15**(2): p. 259-69.
311. Madonna, S., et al., *Structure-activity relationships and mechanism of action of antitumor bis-8-hydroxyquinoline substituted benzylamines*. *Eur J Med Chem*. **45**(2): p. 623-38.
312. Del Poeta, M., et al., *Comparison of in vitro activities of camptothecin and nitidine derivatives against fungal and cancer cells*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(12): p. 2862-8.
312. Hulleman, E., et al., *Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells*. *Blood*. 2009. **113**(9): p. 2014-21

