

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Analyse phénotypique d'une souris déficiente pour TMEM45A

Beaurir, Aurélie

Award date:
2015

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

ANALYSE PHENOTYPIQUE D'UNE SOURIS DEFICIENTE POUR TMEM45A

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Aurélie BEAURIR

Janvier 2015

Analyse phénotypique d'une souris déficiente pour TMEM45A

BEAURIR Aurélie

Résumé

La résistance des cellules cancéreuses aux traitements représentent une cause majeure d'échec des traitements chez les patients cancéreux. Différents éléments favorisent l'apparition de mécanismes de résistance dont l'hypoxie, qui est une caractéristique d'un grand nombre de tumeurs solides. En étudiant la modification de l'expression des gènes en hypoxie et en présence d'agents chimiothérapeutiques, il a été découvert que TMEM45A, une protéine transmembranaire dont le rôle est inconnu, est régulé positivement dans ces conditions. En supprimant l'expression en ARN_m de TMEM45A par l'utilisation de siRNA, il a été montré que la résistance des cellules MDA-MB-231 et HepG2 à la mort induite respectivement par le paclitaxel ou l'étoposide observée en hypoxie est supprimée. Ces résultats ont donc suggéré un rôle de TMEM45A dans la résistance à la mort induite par des agents chimiothérapeutiques.

À partir de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) déficientes pour TMEM45A, le rôle de TMEM45A a été étudié. Nous avons tout d'abord montré que TMEM45A est localisé au niveau de l'appareil de Golgi, que son expression était induite par l'hypoxie dans les MEFs sauvage mais était indétectable dans les MEFs knockout pour TMEM45A. L'objectif principal de ce travail était d'étudier la sensibilité des MEFs sauvage et knockout pour TMEM45A à la mort induite par un agent chimiothérapeutique. L'étoposide n'ayant pas induit la mort des MEFs, la doxorubicine a été testée et choisie pour la suite des expériences. Les résultats n'ont pas mis en évidence de différence entre les MEFs sauvage et knockout pour TMEM45A quant à leur sensibilité à la mort induite par la doxorubicine. Cependant, l'implication de TMEM45A dans un phénomène de résistance de cellules cancéreuses à la mort induite par la doxorubicine n'est pas connue. Dans ce travail, trois lignées cellulaires cancéreuses ont été utilisées mais les résultats obtenus n'ont pas montré la mort de ces cellules cancéreuses en présence de doxorubicine.

TMEM45A est connu pour être fortement exprimé dans la peau. Il a été montré une augmentation de l'expression de TMEM45A dans des kératinocytes différenciés. De plus, TMEM45A est principalement localisé au niveau des épidermes kératinisés. La localisation tissulaire de TMEM45A a été évaluée dans la peau des souris, ainsi que dans le rein. Au niveau de la peau, les résultats coïncident avec ceux de la littérature. En ce qui concerne l'expression de TMEM45A dans le rein, des études supplémentaires doivent être réalisées afin de confirmer les résultats obtenus dans ce travail.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: C. Michiels

Remerciements

Avant de rentrer dans le vif du sujet de ce mémoire, je voudrais remercier toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, « ont mis leur pierre à l'édifice ». En effet, l'aventure qu'est le mémoire est une aventure partagée, difficilement réalisable en solitaire.

Je tiens tout d'abord à remercier les « seniors » de l'URBC pour leur accueil, et tout particulièrement Carine Michiels, ma promotrice. Merci de m'avoir encouragée tout au long de ce mémoire, de m'avoir poussée plus loin dans mon travail, d'avoir été disponible et à l'écoute, de m'avoir conseillée,...

Merci à Edith, pour la patience qu'elle a eu à m'apprendre les bonnes pratiques au laboratoire ainsi que pour son aide lors des difficultés que j'ai rencontrées.

Merci à l'équipe HIF pour son écoute lors des réunions ainsi que pour ses conseils. Merci à tous les autres membres de l'URBC, en particulier les techniciens toujours disponibles pour répondre à mes différentes questions. Je tiens également à faire une note particulière pour Guy qui, par sa bise matinale, lançait mes journées sur une note de convivialité.

Ayant eu un certain nombre de manip en dehors de l'URBC, je tiens à remercier les membres du LabCeTi, du laboratoire de physiologie générale et du laboratoire de génétique pour leur accueil et leur aide.

Comment ne pas remercier les autres mémorants, en particulier mes deux acolytes du bureau, Dimitri (plus connu sous de L'éééééoon le paon) et Céline (dite la cascadeuse). Grâce à eux, ces dix mois furent remplis de rires et de bonne humeur. Toujours à l'écoute, j'ai pu me confier à eux dans les bons comme dans les moments difficiles. Merci également à Céline E. qui a permis à ces cinq années d'étude d'être également placées sous le signe de l'amitié.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, principalement mes parents qui m'ont toujours soutenue, et Tonio qui a su se montrer patient et compréhensif durant ces 10 mois de dur labeur.

Aurélie

LISTE DES ABREVIATIONS

2-OG	2-oxoglutarate
5-FU	5-fluorouracile
ABC	ATP-binding cassette
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN _c	ADN complémentaire
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
ANOVA	analysis of variance
APAF-1	apoptotic protease-activating factor-1
ARF	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
ARN	acide ribonucléique
ARN _m	ARN messenger
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATP	adénosine triphosphate
ATR	ataxia telangiectasia and RAD3-related
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-X _L	Bcl-2-like protein 1
BCRP	breast cancer resistance protein
BH	Bcl-2 homology
bHLH	basic helix-loop-helix
Bid	Bcl-2-interacting domain
Bim	Bcl-2-like protein 11
Bnip3	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
bp	paires de bases
BRCA1	breast cancer 1
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
CAD	caspase activated DNase
CARD	caspase activation and recruitment domains
CBP	CREB-binding protein
CEBP α	CCAAT-enhancer binding protein- α
Chk1	checkpoint kinase-1
Chk2	checkpoint kinase-2
CHOP	CEBP homologous protein
Cq	quantification cycle
Cre	causes recombination
C-TAD	carboxy terminal transactivation domain
CTL	contrôle
CTL+	contrôle positif
D	doxorubicine
DCIS	ductal carcinoma in situ
DD	death domain
DED	death effector domain
DERP7	dermal papilla-derived protein 7
DIABLO	direct IAP binding protein with low pI

LISTE DES ABREVIATIONS

DISC	death inducing signal complex
DMEM	Dulbelcco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxyde
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	dithiothréitol
dUTP	déoxyuridine triphosphate
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	Fas-associated death domain
FIH-1	factor inhibiting HIF-1
FOXO3A	forkhead box O3
GM130	golgi matrix protein of 130 kDa
H	hypoxie
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIFs	hypoxia-inducible factors
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
HRE	hypoxia response element
IAPs	inhibitors of apoptosis
ICAD	inhibitor of caspase activated DNase
JNK	jun amino-terminal kinases
KO	knockout
LDH	lactate déshydrogénase
LoxP	locus of X-over P1
MDM2	mouse double minute 2
MDR	multi-drug resistance
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
MRP1	MDR-associated protein 1
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium
N	normoxie
NAD (NAD ⁺ /NADH)	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée / forme réduite)
NOXA	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NP-40	nonylphenylpolyethylene glycol
N-TAD	amino terminal transactivation domain
ODDD	oxygen dependent degradation domain
p300	adenovirus E1A-associated 300-kDa protein
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PAS	Per-ARNT-Sim
P.A.S.	periodic acid Schiff
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldéhyde
PHD	prolyl hydroxylase
PI3K	phosphatidyl-inositol 3-kinase
PIB	phosphatase inhibitor buffer
PIC	protease inhibitor cocktail
Pin 1	prolyl isomerase 1

LISTE DES ABREVIATIONS

PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
PNPP	para-nitrophenylphosphate
pO ₂	pression partielle en oxygène
PPIE	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E
PVDF	polyvinylidene fluoride
pVHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor protein
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
Rab8	Ras-related protein 8
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction
SAGs	skin associated genes
SAPK	stress-activated protein kinases
SDS	sodium dodecyl sulfate
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
TBP	TATA box binding protein
TMEM45A	transmembrane protein 45 A
TMEM45A ^{+/+}	WT pour TMEM45A
TMEM45A ^{+/-}	hétérozygote pour TMEM45A
TMEM45A ^{-/-}	KO pour TMEM45A
TMEM205	transmembrane protein 205
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNFR associated death domain
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV	ultra-violet
VAMP3	vesicle-associated membrane protein 3
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	sauvage
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

TABLE DES MATIERES

<u>AVANT-PROPOS</u>	1
<u>I. INTRODUCTION</u>	2
1. Thérapies anticancéreuses	2
1.1. Chirurgie.....	2
1.2. Radiothérapie.....	2
1.3. Chimiothérapie	2
2. L'apoptose	3
2.1. Généralités.....	3
2.2. Les caspases	4
o Structure	4
o Substrats des caspases	5
2.3. Les voies de l'apoptose	5
o Voie intrinsèque.....	5
o Voie extrinsèque.....	6
o Voie perforine/granzyme.....	7
2.4. Le gardien du génome, p53	7
o Structure	7
o Régulation	8
o p53 et l'apoptose.....	8
2.5. Détection de l'apoptose	8
2.6. L'apoptose et les thérapies anticancéreuses	9
3. Résistance aux traitements.....	10
4. L'hypoxie	11
4.1. Généralités.....	11
4.2. Adaptation à l'hypoxie	11
4.3. Les facteurs de transcription HIFs.....	12
4.4. HIF-1	12
o Structure	12
o En normoxie	13
o En hypoxie.....	14
o Gènes cibles de HIF-1	14
o HIF-1 et apoptose	14
4.5. Hypoxie et traitements anticancéreux.....	14
5. TMEM45A	15
5.1. Découverte de son implication dans le phénomène de résistance induit par l'hypoxie	15
5.2. Quid de TMEM45A ?.....	16
5.3. TMEM205, un autre gène encodant une protéine transmembranaire, associé à un phénomène de résistance	16
Objectifs	18

TABLE DES MATIERES

II. MATERIELS ET METHODES	19
1. Génération d'une souris déficiente pour TMEM45A	19
2. Génotypage des souris	19
3. Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs)	19
3.1. Extraction de MEFs à partir d'embryons	19
3.2. Génotypage.....	20
4. Lignées cancéreuses	20
5. Incubation des cellules en hypoxie et/ou en présence d'un agent chimiothérapeutique.....	20
6. Test de viabilité cellulaire au MTT	20
7. Test d'incorporation du BrdU.....	21
8. Test de cytotoxicité par mesure du relargage de la lactate déshydrogénase (LDH).....	21
9. Mesure de l'activité caspase-3	22
10. Marquage en immunofluorescence.....	23
11. RT-qPCR	24
11.1. Extraction de l'ARN total.....	24
11.2. Rétro-transcription.....	24
11.3. PCR en temps réel	24
12. Western-Blot.....	25
12.1. Extraction protéique	25
12.2. Dosage par le réactif de Pierce	25
12.3. Préparation des échantillons	26
12.4. Électrophorèse	26
12.5. Transfert	26
12.6. Blocage.....	26
12.7. Révélation.....	27
13. Détection de l'activité β -galactosidase sur des organes	27
14. Coloration P.A.S.....	28
15. Tests urinaires.....	28
15.1. Mise des souris en cage métabolique	28
15.2. Mesure de l'osmolarité	29
15.3. Mesure du glucose.....	29
15.4. Dosage de la créatinine.....	29
16. Analyse statistique.....	29
III. RESULTATS	30
Génotypage.....	30
o Quand la Cre recombinase n'est pas exprimée.....	30
o Quand la Cre recombinase est exprimée	30
Première partie : Expériences <i>in vitro</i>	32

TABLE DES MATIERES

1. Expression de TMEM45A dans les MEFs	32
1.1. Analyse de l'expression de TMEM45A en normoxie	32
1.2. Analyse de l'expression de TMEM45A en hypoxie	33
1.3. Localisation de TMEM45A dans les MEFs	33
2. Étude de la mort des MEFs induite par des agents chimiothérapeutiques.....	34
2.1. Quel agent anticancéreux pour induire la mort des MEFs ?.....	34
o Effets de l'étoposide sur la viabilité des MEFs	34
o Effets de la doxorubicine sur la viabilité des MEFs	34
2.2. Effets de la doxorubicine sur la viabilité des MEFs en fonction de leur génotype	35
2.3. Effets de la doxorubicine sur l'apoptose des MEFs incubés en hypoxie	36
3. Effets de la doxorubicine sur des lignées cancéreuses	37
3.1. Effets de la doxorubicine sur les cellules HepG2.....	37
3.2. Effets de la doxorubicine sur les cellules MDA-MB-231	37
3.3. Effets de la doxorubicine sur les cellules HCT116	38
4. Prolifération des MEFs.....	39
Deuxième partie : Expériences <i>in vivo</i>	40
1. Étude de l'expression protéique tissulaire de TMEM45A en western-blot.....	40
2. Détection de l'activité β -galactosidase dans les tissus	40
2.1. Dans la peau	40
2.2. Dans le rein.....	41
3. Évaluation de la fonction rénale	42
 IV. <u>DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE</u>	44
Première partie : Discussion et perspectives des résultats <i>in vitro</i>	44
Deuxième partie : Discussion et perspectives des résultats <i>in vivo</i>	48
Conclusion générale	49
 V. <u>REFERENCES</u>	50
Bibliographie	50
Webographie	55

Avec 14,1 millions de nouveaux cas de cancer, 8,2 millions de mort du cancer et 32,6 millions de personnes vivant avec le cancer en 2012, le cancer est un important problème de santé dans le monde. Une explication à l'augmentation du nombre de nouveaux cas est le vieillissement de la population. En effet, l'incidence des cancers est plus importante chez les individus âgés. L'incidence des cancers varie donc avec l'âge des individus mais aussi avec le sexe, la région habitée, ... (données de l'Organisation Mondiale de la Santé). Différents facteurs de risque sont associés au développement d'un cancer. Certains sont des facteurs de risque externes, comme le tabac, et d'autres des facteurs de risque interne, comme les mutations héréditaires.

Le cancer n'est pas une maladie unique. Ce terme « cancer » regroupe un ensemble de maladies qui sont caractérisées par la prolifération anarchique et la dissémination de cellules anormales. Le processus de transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse est appelé carcinogénèse. Une cellule normale subit des altérations génétiques et cela mène à la prolifération anarchique de celle-ci. Une masse de cellules anormales se forment, c'est la tumeur. Au cours de leur prolifération, les cellules anormales subissent d'autres altérations génétiques. La population cellulaire tumorale est donc très hétérogène. Les cellules cancéreuses envahissent les tissus voisins et peuvent également se retrouver dans la circulation. Elles sont alors transportées au travers du corps où elles peuvent sortir de la circulation et s'installer dans d'autres tissus, ce qui forme des métastases.

Bien que décrit depuis l'antiquité, le cancer est resté longtemps une maladie inconnue et encore aujourd'hui, de nombreux aspects restent imprécis. Avec le développement de la médecine et les nombreuses découvertes en biologie, des traitements ont été mis sur pied, notamment la chimiothérapie. Cependant, il n'est pas rare d'observer une inefficacité de ces traitements à éliminer le cancer chez les patients. Cette inefficacité est due à l'apparition de phénomène de résistance des cellules cancéreuses à la mort induite par les traitements. Un facteur influençant l'apparition de ces résistances est l'hypoxie, une caractéristique retrouvée dans de nombreuses tumeurs.

Au vu du nombre de personnes atteintes par le cancer, comprendre les mécanismes sous-jacents à l'apparition des phénomènes de résistance aux traitements est aussi important que trouver de nouvelles stratégies de traitements. Ce travail s'intéresse à une protéine, TMEM45A, qui pourrait avoir un rôle dans la résistance de certaines cellules cancéreuses à certains traitements chimiothérapeutiques.

I. INTRODUCTION

1. Thérapies anticancéreuses

Au vu du nombre important de personnes qui vivent avec et qui en meurent, le cancer est un problème mondial et trouver des traitements était et est toujours un important challenge de la médecine.

1.1. Chirurgie

Dans l'antiquité, les traitements correspondaient principalement à des préparations locales, contenant régulièrement des composés chimiques forts comme de l'arsenic ou du mercure (Hajdu, 2011). De plus, des ablations de masses tumorales ont également été décrites à cette époque (Papac, 2001). Avec le développement de la médecine, la chirurgie s'est répandue, y compris pour le traitement des cancers. La chirurgie était d'ailleurs la thérapie anticancéreuse la plus répandue jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle. En effet, jusqu'à cette époque, peu de choses étaient connues sur les mécanismes biologiques menant à l'apparition de cellules cancéreuses, faisant de la chirurgie une méthode de choix (Chabner and Roberts, 2005). Avec les progrès technologiques, la chirurgie est devenue de moins en moins invasive et reste donc utilisée de nos jours, aussi bien pour le diagnostic (biopsie), que pour le traitement, principalement des tumeurs primaires (Reed, 2009). Cependant, il n'est pas rare qu'un cancer réapparaisse après une chirurgie et c'est pourquoi elle est souvent combinée à la radiothérapie et/ou la chimiothérapie (Sudhakar, 2009).

1.2. Radiothérapie

La radiothérapie s'est développée avec la découverte des rayons-X par Roentgen et les techniques se sont depuis améliorées (Kaplan, 1979). En plus d'être utilisée pour le traitement des cancers dans un but de soin ou dans un but palliatif, elle l'est aussi pour leur diagnostic (Sudhakar, 2009). Cependant, malgré ses effets en thérapie anticancéreuses, la radiothérapie est également une cause de cancer car elle est susceptible d'engendrer des dommages à l'ADN acide désoxyribonucléique au niveau des cellules saines (Hajdu, 2012).

Le principe de la radiothérapie est d'envoyer un rayon ionisant au niveau de la tumeur afin de la détruire (Greenhalgh and Symonds, 2014). Après l'absorption de l'énergie des photons au niveau des tissus, il y a ionisation et excitation d'atomes qui peuvent alors aller réagir avec des composants cellulaires ce qui mène finalement à la mort cellulaire. En plus de la mort cellulaire en elle-même, les radiations peuvent aussi mener à une diminution de la vascularisation tumorale et à l'augmentation de la reconnaissance immunitaire (Gwynne and Staffurth, 2012).

La radiothérapie n'est pas efficace pour toutes les tumeurs (Murray and Robinson, 2011). En effet, différents facteurs influencent la réponse d'une tumeur aux radiations dont la radiosensibilité intrinsèque qui correspond à la capacité des cellules de réparer ou non les lésions induites par les radiations. De plus, en fonction du type de tumeurs, le type de radiation utilisé sera différent, avec principalement l'utilisation des photons (Gwynne and Staffurth, 2012). Le problème de la radiothérapie est qu'elle peut également endommager les tissus sains. Le traitement fractionné est utilisé afin de réduire ce risque (Greenhalgh and Symonds, 2014).

1.3. Chimiothérapie

Alors que la chirurgie et la radiothérapie sont des traitements locaux, la chimiothérapie est un traitement systémique. Le traitement des cancers métastatiques se fait principalement par de

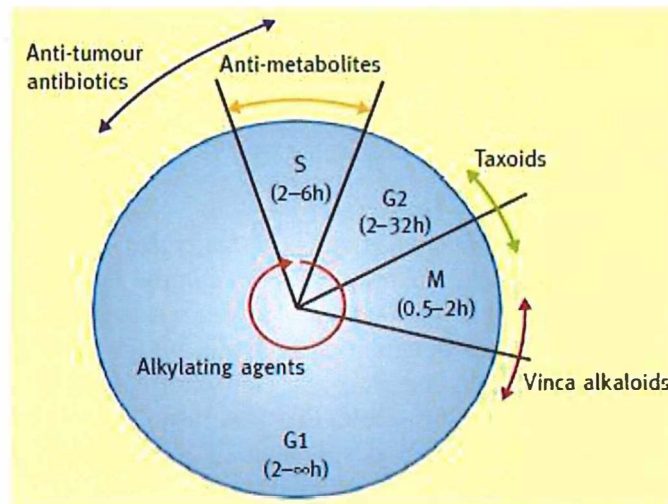


Figure I-1 : Actions des agents chimiothérapeutiques pendant le cycle cellulaire. (Caley and Jones, 2012)

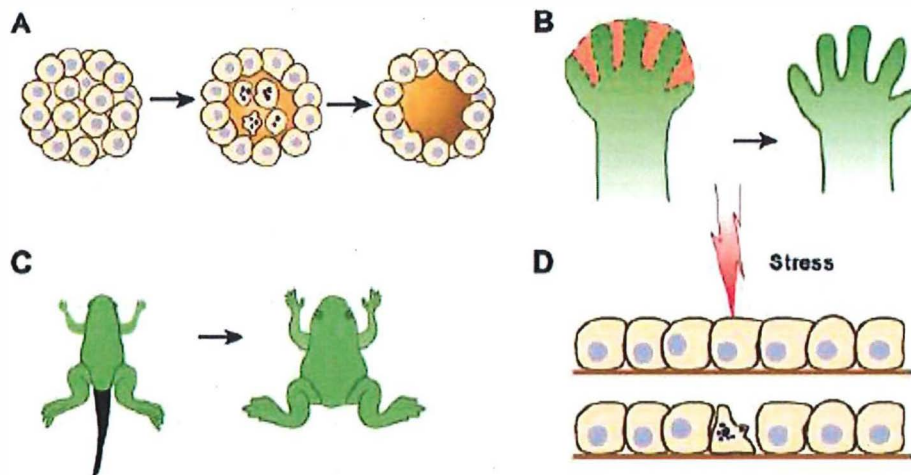


Figure I-2 : Exemple d'intervention de l'apoptose. (A) Formation des cavités du corps au cours du développement embryonnaire et régulation homéostatique du nombre de cellules. (B) Apoptose des cellules interdigitales lors de la morphogenèse des doigts et des orteils. (C) Ablation des structures résiduelles durant la métamorphose. (D) Elimination des cellules ayant subi un stress. (Saikumar et al., 1999)

tels traitements. En effet, ceux-ci permettent un accès à un grand nombre de sites puisqu'ils sont délivrés via la circulation sanguine (Greenhalgh and Symonds, 2014).

La découverte de l'efficacité des moutardes azotées (agents alkylants) comme agents anticancéreux marque le début de l'ère de la chimiothérapie moderne (Chabner and Roberts, 2005). Le principe des agents chimiothérapeutiques est d'interrompre le cycle cellulaire, qui est dérégulé positivement dans les cellules cancéreuses. Les mécanismes pour y arriver diffèrent selon l'agent chimiothérapeutique.

Une façon de classer les agents chimiothérapeutiques est de le faire selon leurs propriétés biochimiques. Les agents alkylants forment des ponts covalents avec les protéines, l'ADN ou l'ARN (acide ribonucléique). L'action des anti-métabolites se passe au niveau de la synthèse de l'ADN et de l'ARN par incorporation de l'anti-métabolite à la place de la molécule normale ou par compétition au niveau de l'enzyme. Un exemple d'anti-métabolites est le 5-fluorouracile (5-FU). Les agents chimiothérapeutiques peuvent également agir au niveau de l'ADN en s'y intercalant. C'est le cas des antibiotiques anti-tumoraux, comme les anthracyclines. Les inhibiteurs de topoisomérase, comme l'étoposide, agissent indirectement sur l'ADN. En effet, les topoisomérases contrôlent la structure de l'ADN. Enfin, il y a les drogues de liaison à la tubuline qui interfèrent avec les microtubules, structures jouant un rôle important lors de la division cellulaire. Les taxanes et les vinca-alcaloïdes appartiennent à ce groupe d'agents chimiothérapeutiques. En fonction du moment du cycle cellulaire, les agents chimiothérapeutiques auront une activité optimale (Figure I-1). Par exemple, les anti-métabolites sont surtout efficaces lors de la phase S (phase de synthèse), alors que les drogues de liaison à la tubuline sont plus efficaces pendant la phase M (mitose) (Caley and Jones, 2012).

La toxicité des chimiothérapies est un réel problème. En effet, les agents chimiothérapeutiques ciblent la division cellulaire mais les cellules cancéreuses ne sont pas les seules à se diviser dans le corps. Les cellules saines proliférant à un rythme soutenu, comme les cellules de la muqueuse intestinale ou les cellules des bulbes pileux, sont donc également ciblées ce qui entraîne des effets secondaires, notamment la chute des cheveux. Il existe également des toxicités spécifiques aux classes d'agents chimiothérapeutiques (Caley and Jones, 2012).

Par leurs actions sur les cellules, principalement en engendrant des dommages à l'ADN, la chimiothérapie et la radiothérapie induisent l'apoptose de celles-ci (Caley and Jones, 2012 ; Gwynne and Staffurth, 2012).

2. L'apoptose

2.1. Généralités

L'apoptose est un processus physiologique de mort programmée (Hengartner, 2000). Le terme « apoptose » a été utilisé pour la 1^{ère} fois en 1972 par Kerr et son équipe afin de décrire les caractéristiques morphologiques partagées par des cellules en train de mourir (Kerr et al., 1972). L'apoptose joue un rôle essentiel dans la vie d'un organisme (Figure I-2). Un exemple de rôle de l'apoptose est la suppression des palmes interdigitales lors du développement embryonnaire. L'apoptose est aussi retrouvée dans le processus de métamorphose pour la suppression de structures résiduelles. De plus, elle intervient dans l'homéostasie des tissus en régulant le nombre de cellules. En effet, de nombreux tissus produisent des cellules en trop grand nombre et donc certaines sont programmées pour mourir. L'apoptose intervient également dans la suppression de cellules anormales et dangereuses (Saikumar et al., 1999). D'un point de vue

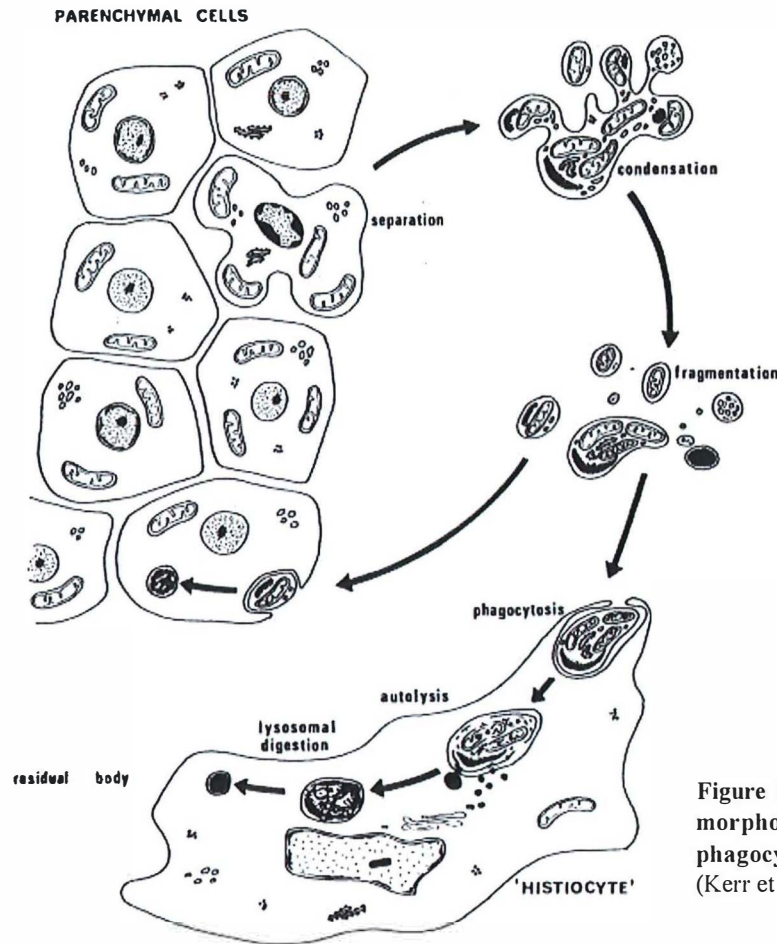


Figure I-3 : Principales caractéristiques morphologiques de l'apoptose jusqu'à la phagocytose des corps apoptotiques. (Kerr et al., 1972)

Caspase	Rôle physiologique	Homologue humain
1 (ICE)	Activation de cytokines	Oui
2 (Nedd2, ICH-1)	Initiateur apoptotique	Oui
3 (CPP32, Yama, apopain)	Effecteur apoptotique	Oui
4 (ICE _{rel} II, TX, ICH-2)	Activation de cytokines	Oui
5 (ICE _{rel} III, TY)	Activation de cytokines	Oui
6 (Mch2)	Effecteur apoptotique	Oui
7 (Mch3, ICE-LAP3, CMH-1)	Effecteur apoptotique	Oui
8 (Mch5, MACH, FLICE)	Initiateur apoptotique	Oui
9 (ICE-LAP6, Mch6)	Initiateur apoptotique	Oui
10 (Mch4)	Initiateur apoptotique	Oui
11 (ICH-3)	Activation de cytokines	Non
12	Activation de cytokines	Non
13 (ERICE)	Activation de cytokines	Non
14 (MICE)	Activation de cytokines	Non

Tableau I-1 : Les caspases. (adapté de Ashe and Berry, 2003))

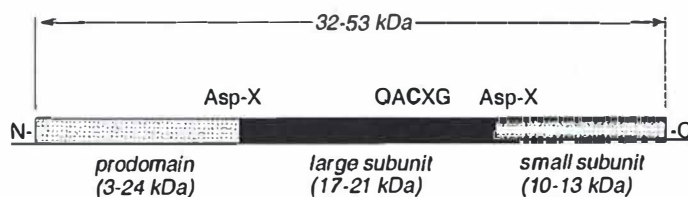


Figure I-4 : Structure des pro-caspases. (Nicholson, 1999)

évolutif, l'apoptose est un processus conservé au travers des espèces (Fuchs and Steller, 2011). On la retrouve aussi bien chez *Caenorhabditis elegans*, que chez la drosophile et les mammifères, chez qui sa machinerie est la plus complexe.

Lorsque les cellules subissent l'apoptose, des changements morphologiques sont observables (Figure I-3). La cellule apoptotique se sépare de ses voisines. Son cytoplasme se condense ainsi que son noyau (pycnose) qui se fragmente. Au final, la cellule se fragmente en petites vésicules rondes ou ovoïdes entourées d'une membrane, appelées corps apoptotiques, qui vont être phagocytées par d'autres cellules (Kerr et al., 1972). Comme les cellules en apoptose ne libèrent pas leur contenu et que les corps apoptotiques sont phagocytés par des cellules voisines, l'apoptose ne produit pas de réaction inflammatoire (Elmore, 2007).

Les changements morphologiques accompagnant l'apoptose sont différents de ceux de la nécrose, un autre type de mort cellulaire qui provoque une réaction inflammatoire. Ceux-ci correspondent principalement à un gonflement cellulaire, l'apparition de vacuoles et la rupture de la membrane plasmique (Kerr et al., 1994). De plus, la nécrose touche une zone tissulaire et les cellules qui la composent, et est incontrôlée et passive alors que l'apoptose touche une cellule de manière individuelle, est contrôlée et demande de l'énergie. Pour ces deux types de mort, le stimulus peut être identique et c'est en fonction de son degré d'intensité que la cellule mourra par apoptose ou par nécrose (Elmore, 2007).

Différentes voies peuvent enclencher le processus d'apoptose mais toutes ces voies ont en commun les caspases, qui correspondent aux acteurs centraux de l'apoptose. Le signal menant à l'apoptose peut provenir des récepteurs de mort (voie extrinsèque) ou de la mitochondrie (voie intrinsèque).

2.2. Les caspases

Les caspases sont des protéases (cystéine aspartyl-specific protease) qui sont les acteurs centraux de l'apoptose. Elles clivent leurs substrats après un résidu aspartate, après la séquence en acides aminés DEVD (Hengartner, 2000). Elles sont présentes en tout temps dans la cellule, sous forme de pro-caspases inactives. Cela permet d'avoir toute la machinerie prête et donc une réponse rapide en cas de stimulus apoptotique (Strasser et al., 2000). Sur les 14 membres mammifères de la famille des gènes encodant les caspases (Tableau I-1), 11 caspases humaines sont connues. Cette famille de gènes peut être divisée en deux groupes, les caspases du groupe inflammatoire et les caspases du groupe apoptotique (Zimmermann et al., 2001). Au niveau fonctionnel, deux types de caspases peuvent être distinguées dans le groupe des caspases apoptotiques (Thornberry and Lazebnik, 1998). D'un côté, il y a les caspases initiateuses qui répondent aux stimuli pro-apoptotiques et de l'autre, il y a les caspases effectrices qui sont responsables des caractéristiques morphologiques de l'apoptose.

○ Structure

D'un point de vue structurel, les pro-caspases ont un poids moléculaire entre 32 et 53 kDa et sont composées de trois domaines (Figure I-4) : le prodomaine du côté N-terminal, la grande sous-unité et la petite sous-unité du côté C-terminal. Ces parties peuvent être séparées les unes des autres par un clivage après un résidu aspartate (Nicholson, 1999). La petite et la grande sous-unités s'associent pour former un hétérodimère (Thornberry and Lazebnik, 1998). Ensuite, l'association de deux hétérodimères forment un tétramère. Cela correspond à la forme active des caspases avec deux domaines catalytiques (Ashe and Berry, 2003). Une caractéristique des

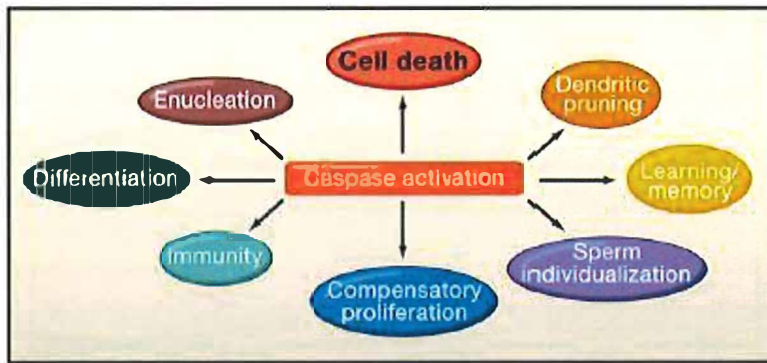


Figure I-5 : Processus cellulaires ciblés par les caspases activées. (Fuchs and Steller, 2011)

caspases est qu'elles sont capables de s'auto-activer permettant une amplification de la cascade signalétique. Cela s'explique par le fait qu'elles clivent leurs substrats après un résidu aspartate et que leur maturation passe par le clivage des pro-caspases au niveau de résidus aspartates (Zimmermann et al., 2001). Le prodomaine des caspases initiateurs est plus long que celui des caspases effectrices. Il contient un ou deux exemplaire d'un domaine effecteur de mort (DED (death effector domain)) ou d'un domaine de recrutement des caspases (CARD (caspase activation and recruitment domains)) (Chowdhury et al., 2008).

○ **Substrats des caspases**

La caspase-3 est la caspase qui a le plus d'effets apoptotiques au niveau de la cellule, aidée par les caspases-6 et -7. En effet, ces trois caspases constituent le point commun des deux voies de l'apoptose (voir ci-dessous). Ces caspases effectrices ont un grand nombre de substrats dans la cellule et sont ainsi responsables des caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose (Zimmermann et al., 2001).

Les substrats des caspases peuvent être regroupés en différentes classes : les protéines cytoplasmiques, les protéines nucléaires, les protéines du métabolisme et de réparation de l'ADN, les protéines kinases, les protéines de voies de transduction du signal, les protéines de prolifération cellulaire et du cycle cellulaire, les protéines reliées à une maladie génétique humaine et d'autres protéines reliées à l'apoptose (Chowdhury et al., 2008). L'effet des caspases peut être direct comme dans le cas du clivage des composants du cytosquelette mais également indirect. Dans ce deuxième cas, le clivage du substrat des caspases permet son activation et ce substrat intervient dans le phénotype apoptotique (Nicholson, 1999). C'est par exemple le cas des endonucléases dédiées à l'apoptose (CAD (caspase activated DNase)) qui sont activées par l'inhibition de leur inhibiteur, ICAD (inhibitor of caspase activated DNase). Celui-ci est clivé en deux par les caspases, ce qui fait que CAD est libéré et peut aller cliver l'ADN entre les nucléosomes et engendrer la condensation de la chromatine (Elmore, 2007).

À côté de leurs fonctions dans l'apoptose, les caspases peuvent avoir des rôles non-apoptotiques. Elles peuvent être impliquées dans des fonctions immunes, dans la prolifération cellulaire, dans la différenciation cellulaire, et dans bien d'autres fonctions (Figure I-5) (Chowdhury et al., 2008).

2.3. Les voies de l'apoptose

○ **Voie intrinsèque**

Lorsque la cellule subit un stress, comme un stress oxydatif, un manque de facteur de croissance, des dommages à l'ADN,... des signaux intracellulaires sont émis et intégrés au niveau de la mitochondrie pour activer l'apoptose (Rupinder et al., 2007). En effet, un grand nombre de protéines pro-apoptotiques sont stockées dans la mitochondrie (Ashe and Berry, 2003).

Au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, deux types de protéines intervenant dans l'apoptose sont retrouvées : des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B cell lymphoma 2) et des protéines pro-apoptotiques comme Bax (Bcl-2-associated X protein) (Ashe and Berry, 2003). Ces protéines appartiennent à une même famille de protéines, la famille de protéines Bcl-2 qui influencent la perméabilité de la membrane mitochondriale externe (Igney and

Anti-apoptotic

Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w



Pro-apoptotic

Bax, Bak, Bok



'BH3-only' proapoptotic

Bik, Blk, Hrk,
Bim, Bnip3



Bid, Bad



Figure I-6 : Famille Bcl-2. Les membres de la famille Bcl-2 peuvent être classés en trois sous-familles selon les domaines BH qu'ils possèdent : les membres anti-apoptotiques, les membres pro-apoptotiques et les membres BH3-only. Tous les membres ne possèdent pas le domaine d'ancrage à la membrane (TM).

(Zimmermann et al., 2001)

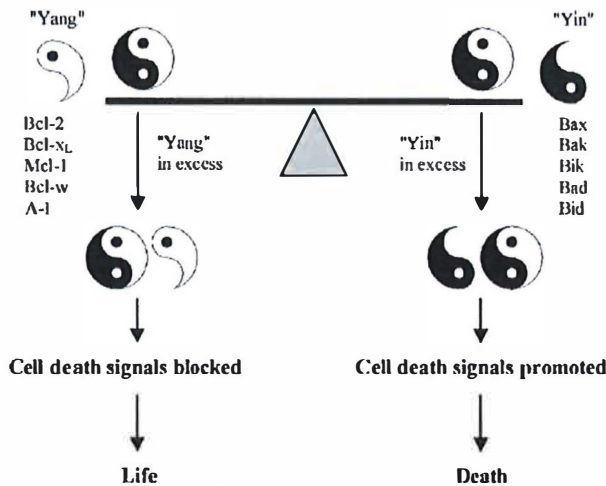


Figure I-7 : Balance entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et réponse en cas de déséquilibre. (Huang, 2002)

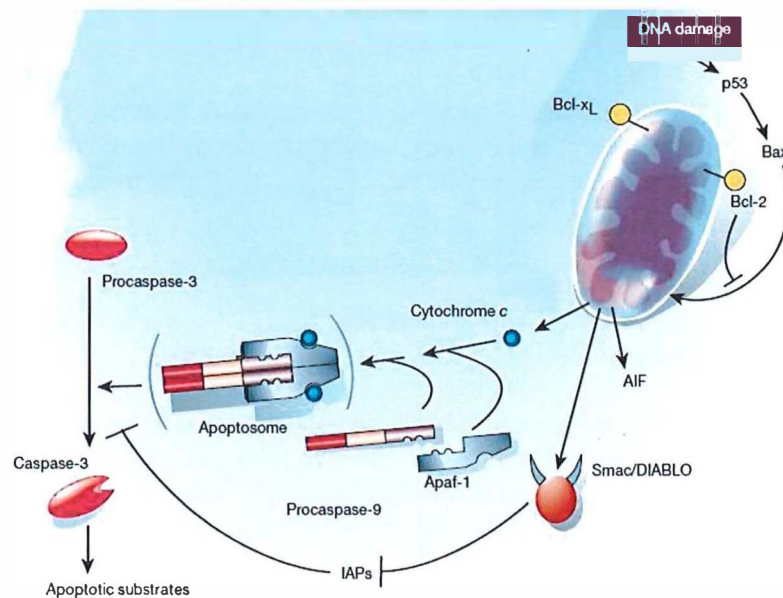


Figure I-8 : Voie intrinsèque de l'apoptose. Lorsqu'une cellule subit un stress (comme des dommages à l'ADN), la machinerie apoptotique peut être enclenchée. Cela passe par des médiateurs (comme p53). Un déséquilibre apparaît entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, en faveur des protéines pro-apoptotiques. Cela a pour conséquence la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Dans le cytoplasme, le cytochrome c forme l'apoptosome en s'associant avec APAF-1 et la pro-caspase-9. Cela résulte en l'activation de cette dernière qui peut à son tour activer la pro-caspase-3. D'autres protéines pro-apoptotiques sont libérées de la mitochondrie avec le cytochrome c, comme Smac/DIABLO qui inhibe les IAPs, renforçant l'activation de la caspase-3. (adapté de Hengartner, 2000)

Krammer, 2002). La caractéristique de cette famille est la présence de minimum un des quatre domaines d'homologie de Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 et BH4) dans la séquence de ces protéines. En fonction des domaines BH (Bcl-2 homology) que possède une protéine, elle sera pro- ou anti-apoptotique (Figure I-6). Les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L (Bcl-2-like protein 1),...) contiennent les quatre domaines alors que les protéines pro-apoptotiques ne contiennent pas le BH4 (Bax, Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer),...) ou ne contiennent que le BH3 (protéines BH3-only ; Bad (Bcl-2-associated death promoter), Bid (Bcl-2-interacting domain),...) (Zimmermann et al., 2001). Cette famille de protéines avec des rôles opposés peut être comparée au « yin and yang ». Lorsque les protéines anti-apoptotiques sont en excès, les signaux de mort cellulaire sont bloqués. À l'inverse, lorsque les protéines pro-apoptotiques sont en excès, la mort cellulaire est enclenchée (Figure I-7) (Huang, 2002).

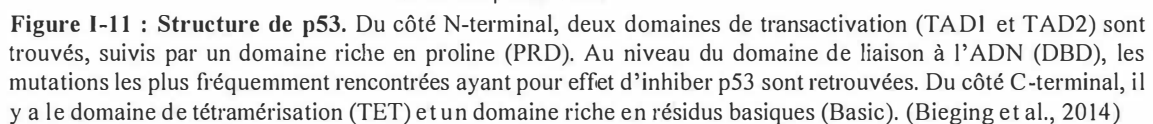
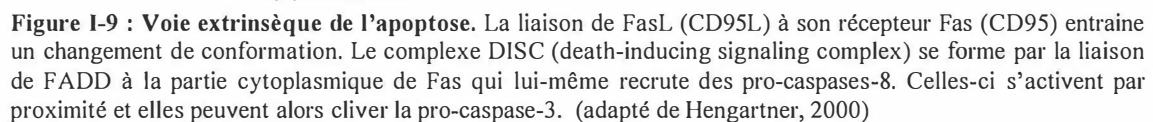
À l'état basal, les protéines anti-apoptotiques inhibent les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Ces deux protéines peuvent se trouver au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et jouent un rôle important dans sa perméabilisation. Lors de stimuli pro-apoptotiques, les protéines BH3-only sont activées (au niveau transcriptionnel ou au niveau post-traductionnel). Par exemple, au niveau transcriptionnel, les dommages à l'ADN via p53 induisent l'expression de NOXA (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) et PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) alors que Bim (Bcl-2-like protein 11) est induit en réponse à la déprivation en facteur de croissance via FOXO3A (forkhead box O3) et en réponse à un stress du réticulum endoplasmique via CEBP α (CCAAT-enhancer binding protein- α) ou CHOP (CEBP homologous protein). Ces protéines interviennent dans le processus en inhibant les protéines anti-apoptotiques ou en activant directement les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Une fois activées (directement ou secondairement), ces protéines peuvent oligomériser pour former un pore, ce qui permet la libération, dans le cytosol, des protéines pro-apoptotiques contenues dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, en particulier le cytochrome c (Figure I-8) (Youle and Strasser, 2008).

Une fois dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) et en présence d'ATP (adénosine triphosphate), cela induit un changement de conformation d'APAF-1. Ce changement conformationnel permet d'exposer le domaine CARD d'APAF-1. Cela permet le recrutement de la pro-caspase-9 qui est clivée et ainsi activée. Elle active ensuite les pro-caspases effectrices, dont la caspase-3, qui clivent alors leurs substrats. C'est le point de non-retour enclenchant la mort cellulaire (Ashe and Berry, 2003).

Le cytochrome c n'est pas la seule protéine pro-apoptotique à sortir de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie dans le cytosol. Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI) est un inhibiteur des IAPs (inhibitors of apoptosis) qui forment un complexe avec les pro-caspases ce qui les maintient inactives. Cela fait que les IAPs sont inhibées et donc leur effet inhibiteur sur l'activité des caspases est levé (Youle and Strasser, 2008).

○ Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est médiée par les récepteurs de mort de la superfamille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor) et passe par les caspases initiatrices 8 et 10 (Chowdhury et al., 2008). Ces récepteurs contiennent dans leur partie cytoplasmique un domaine de mort (DD (death domain)) qui permet le recrutement de protéines signalétiques (Schultz and Harrington, 2003). Lorsqu'un ligand se lie aux récepteurs de mort, ceux-ci oligomérisent, permettant aux DD d'interagir ensemble et ce qui permet le recrutement d'une protéine adaptatrice. Dans le



cas du couple Fas/FasL qui est impliqué dans divers cas d'apoptose, la protéine adaptatrice est FADD (Fas-associated DD). Celle-ci contient un domaine DED qui permet le recrutement de la pro-caspase-8 et la formation du complexe DISC (death inducing signal complex). La pro-caspase-8 est alors activée et libérée du complexe lui permettant d'activer la pro-caspase-3 (Zimmermann et al., 2001). Dans le cas du TNF et de son récepteur TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor), le recrutement de FADD nécessite une autre protéine adaptatrice contenant également un DD, la protéine TRADD (TNFR associated death domain) (Figure I-9) (Rupinder et al., 2007).

La voie extrinsèque peut également passer par la mitochondrie. En effet, lorsque la quantité de caspase-8 activée par le complexe DISC n'est pas suffisante, il y a un passage par la mitochondrie afin d'amplifier le signal. La caspase-8 activée clive un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, Bid. Ce clivage forme tBid qui transloque à la mitochondrie et permet la libération du cytochrome c. Comme dans la voie intrinsèque, il y a alors formation de l'apoptosome, activation de la caspase-9 et ensuite de la caspase-3 (Chowdhury et al., 2008) ; (Schultz and Harrington, 2003).

○ Voie perforine/granzyme

Les effets cytotoxiques des lymphocytes T sur leurs cellules cibles peuvent passer par la voie extrinsèque de l'apoptose via un récepteur de mort mais ils peuvent également passer par une autre voie. Cette voie passe par la sécrétion de deux types de protéines, les perforines et les granzymes. Les perforines sont des protéines transmembranaires qui sont capables de former un pore. Les granzymes sont des sérine-protéases, libérés par les lymphocytes par dégranulation. Le pore formé par les perforines au niveau de la cellule cible permet l'entrée des granzymes qui peuvent cliver et donc activer les caspases-3 et -10. De plus, les granzymes peuvent activer Bid, ce qui amplifie le signal par un passage par la mitochondrie (Elmore, 2007).

2.4. Le gardien du génome, p53

Le gène p53 est un gène suppresseur de tumeur essentiel au contrôle de l'intégrité du génome des cellules. Il agit comme un régulateur (frein) de la division cellulaire (Vogelstein et al., 2000). Les stress qui activent p53 (dommages à l'ADN, hypoxie, activation d'oncogène,...) sont également retrouvés dans la tumorigenèse, ce qui explique le rôle essentiel de p53 dans la prévention de la croissance tumorale (Ryan et al., 2001). La protéine p53 est un facteur de transcription régulant positivement ou négativement l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans divers processus cellulaires, notamment l'apoptose et le cycle cellulaire (Figure I-10) (Bieging et al., 2014). L'apoptose peut être une réponse tardive à l'activation de p53. En effet, p53 peut mettre la cellule « en pause » jusqu'à ce que le stress qui a causé son activation soit résolu. Si cela n'arrive pas, alors l'apoptose est enclenchée par p53 (Indran et al., 2011).

○ Structure

Au niveau de sa structure, p53 possède différents domaines. Du côté N-terminal, il y a deux domaines de transactivation et un domaine riche en prolines. Pour exercer sa fonction de facteur de transcription, p53 possède un domaine de liaison à l'ADN. C'est à ce niveau que sont retrouvées la plupart des mutations inactivant p53. Du côté C-terminal, un domaine de tétramérisation et un domaine riche en résidus basiques sont présents (Figure I-11) (Bieging et

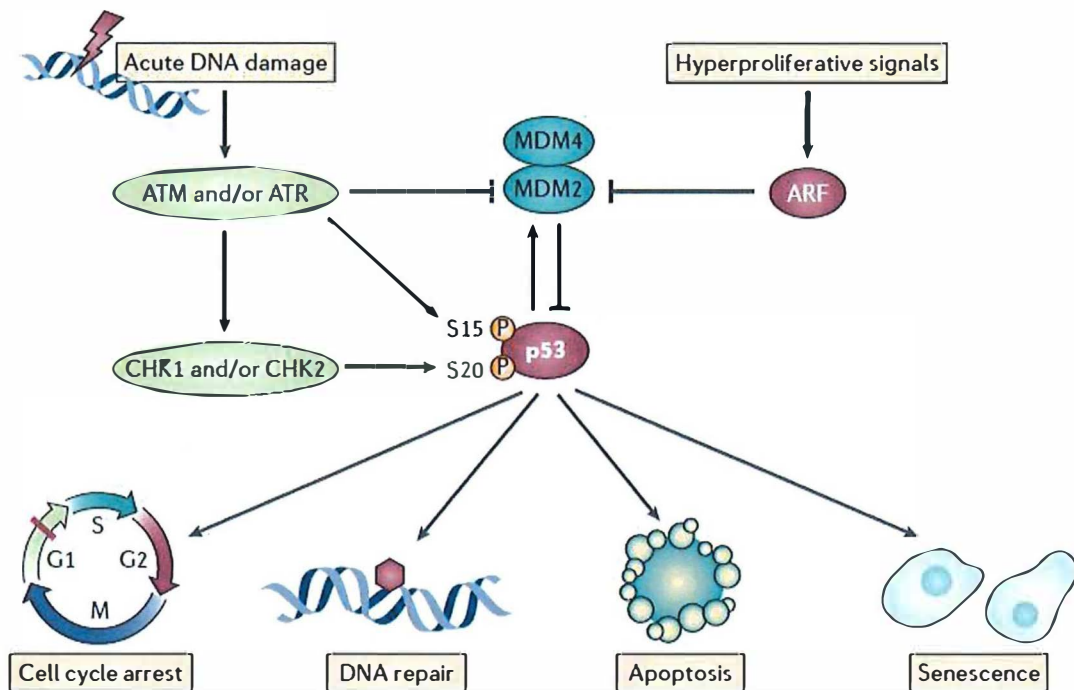


Figure I-12 : Stabilisation de p53 et réponse. Les cassures double brins dans l'ADN entraînent l'activation d'ATM qui phosphoryle la kinase CHK2 alors que les problèmes de fourches de réplication activent ATR qui phosphoryle la kinase CHK1. Ces quatre éléments sont des kinases capables de phosphoryler p53 entraînant sa stabilisation par perturbation de l'interaction de celui-ci avec MDM2 ou MDM4. Les signaux hyper-prolifératifs quant à eux recrutent ARF qui inhibe MDM2 ce qui mène à la stabilisation de p53. Lorsque p53 est stabilisé et activé, il peut augmenter la transcription de ses gènes cibles qui ont une fonction dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, ou la sénescence par exemple. (Biegging et al., 2014)

al., 2014). Diverses modifications post-traductionnelles peuvent survenir au niveau de p53, comme des phosphorylations ou des acétylations (Vousden and Lane, 2007).

○ Régulation

En situation physiologique dans des cellules normales, les niveaux protéiques de p53 sont faibles. En effet, p53 est peu exprimé et subit un turnover rapide. Au vu du rôle de p53 comme inhibiteur de la prolifération cellulaire, il est nécessaire que son activité soit maintenue faible durant la croissance normale et le développement. Pour cela, divers processus existent comme la régulation de son activité, de sa stabilité et de sa localisation cellulaire (Vousden and Lane, 2007).

La protéine MDM2 (mouse double minute 2) joue un rôle important dans cette régulation. D'une part, MDM2 peut se lier aux domaines de transactivation de p53, ce qui l'empêche d'agir au niveau du promoteur de ses gènes cibles (el-Deiry, 1998). Ensuite, elle fonctionne comme une E3 ligase ce qui permet la conjugaison d'ubiquitines à p53 le dirigeant ainsi vers le protéasome pour sa dégradation. De plus, MDM2 est une cible transcriptionnelle de p53 ce qui crée une boucle de rétrocontrôle négatif (Ryan et al., 2001).

La stabilisation de p53 en réponse à un stress peut dépendre de différentes voies, en fonction de la nature de ce stress. De nombreuses protéines sont impliquées dans la stabilisation de p53. Elles ont pour effet d'augmenter la demi-vie de p53 par l'inhibition de MDM2. De plus, ces protéines peuvent également apporter des modifications à p53, par exemple des phosphorylations (Riley et al., 2008). L'activité transcriptionnelle de p53 peut également être influencée par des co-activateurs (Vousden and Lane, 2007). Les dommages les plus connus ayant pour effet de stabiliser et d'activer p53 sont les dommages à l'ADN et les signaux hyperprolifératifs, qui passent respectivement par ATM (ataxia-telangiectasia mutated) et/ou ATR (ataxia telangiectasia and RAD3-related), et ARF (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (Figure I-12).

○ p53 et l'apoptose

En ce qui concerne l'apoptose, l'une des actions de p53 est d'induire l'expression de gènes encodant des protéines apoptotiques, aussi bien de la voie extrinsèque que de la voie intrinsèque (Vousden and Lane, 2007). Au niveau de la voie extrinsèque, p53 peut intervenir en induisant l'expression des récepteurs de mort. Pour la voie intrinsèque, p53 augmente principalement l'expression de protéines BH3-only, comme PUMA et NOXA (Yu and Zhang, 2005). L'apoptose peut également être touchée par p53 par une autre voie, la voie indépendante de la transcription. Dans ce cas, p53 interagit avec les protéines anti-apoptotiques au niveau de la mitochondrie, ce qui libère les protéines pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire. De plus, p53 peut activer directement Bax (Indran et al., 2011).

2.5. Détection de l'apoptose

À côté de sa détection par ses caractéristiques morphologiques, l'apoptose peut être détectée en analysant ses caractéristiques biochimiques.

Une manière de faire est d'analyser la fragmentation de l'ADN. Pour cela, une électrophorèse peut être réalisée. Étant donné que les endonucléases activées durant l'apoptose coupent l'ADN entre les nucléosomes, c'est-à-dire environ toutes les 180 paires de bases, le résultat de

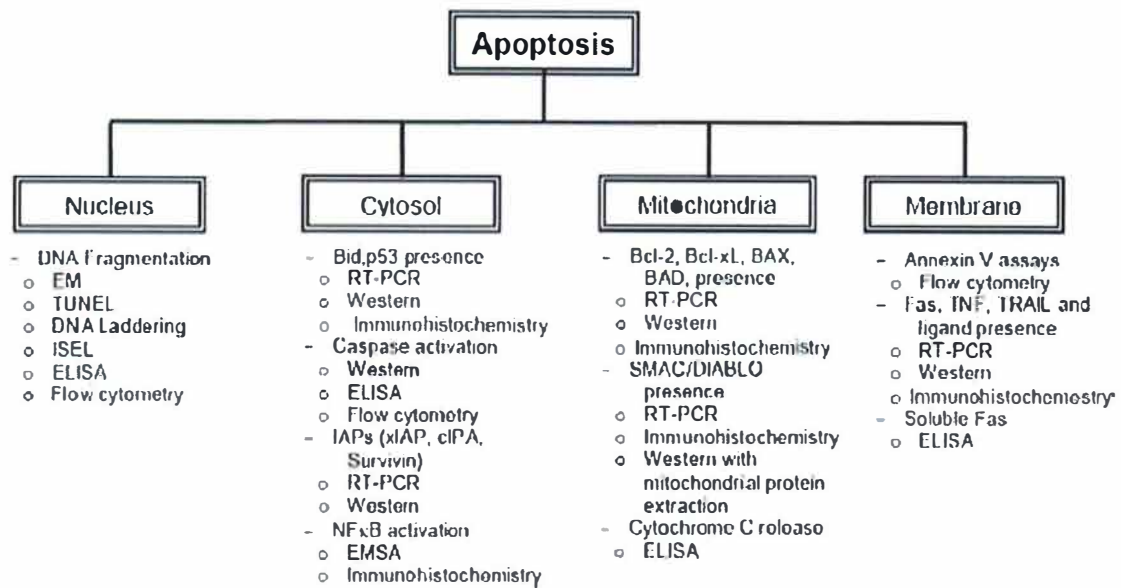


Figure I-13 : Représentation schématique de différentes méthodes permettant d'étudier l'apoptose. (Huerta et al., 2007)

l'électrophorèse est une « échelle » d'ADN dont les bandes sont espacées de 180 paires de bases. La méthode TUNEL permet aussi de repérer l'apoptose via une analyse de l'ADN en ajoutant aux fragments d'ADN du dUTP marqué (Huerta et al., 2007). Le problème de la fragmentation de l'ADN est qu'il s'agit d'un évènement tardif de l'apoptose et il peut donc y avoir de faux négatifs. De plus, il peut y avoir de faux positifs car la fragmentation de l'ADN est aussi retrouvée dans des cellules en nécrose (Elmore, 2007).

L'apoptose peut également être étudiée au niveau des changements qui se passent au niveau de la membrane plasmique. En effet, une caractéristique de l'apoptose est l'externalisation des molécules de phosphatidylsérine, normalement uniquement présentes dans le feuillet cytosolique. Cela permet la reconnaissance de la cellule apoptotique par les cellules voisines pour la phagocytose. Cette extériorisation peut être détectée en utilisant une protéine de liaison à la phosphatidylsérine, l'annexine-V portant un fluorochrome (Elmore, 2007). À nouveau, les cellules nécrotiques peuvent être détectées avec cette technique (Huerta et al., 2007).

Une autre façon d'évaluer l'apoptose est de s'intéresser à l'activation des caspases ou de leurs substrats. Une façon de faire est de réaliser un Western Blot sur lequel le clivage des caspases correspondant à leur activation peut être observé (Elmore, 2007). Il en va de même pour le clivage de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase), un substrat des caspases intervenant dans la réparation de l'ADN (Huerta et al., 2007). L'activation des caspases peut également être étudiée par des tests fonctionnels mettant en évidence leur activité protéolytique (Schultz and Harrington, 2003).

Ces différentes possibilités d'exploration de l'apoptose ne sont pas les seules à exister (Figure I-13), avec pour chaque technique, ses avantages et ses inconvénients, sa sensibilité,...

2.6. L'apoptose et les thérapies anticancéreuses

Les radiations et la plupart des agents chimiothérapeutiques ont pour conséquence l'apparition de dommages à l'ADN. En réponse à ceux-ci, une cascade d'évènements est mise en place via des mécanismes dépendants ou indépendants de p53. Les dommages à l'ADN sont reconnus par des facteurs de liaison à l'ADN, comme BRCA1 (breast cancer 1). Cela mène à un signal d'activation pour des membres de la famille PI3K (phosphatidyl-inositol 3-kinase), comme ATM et ATR qui phosphorylent des kinases effectrices comme Chk1 (checkpoint kinase-1) et Chk2 (checkpoint kinase-2). Celles-ci sont responsables, entre autre, de la phosphorylation de p53. D'une part, la phosphorylation de p53 augmente son affinité de liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle. D'autre part, une fois phosphorylé, p53 est stabilisé car son interaction avec MDM2 est inhibée. p53 ainsi activé augmente la transcription de ses gènes cibles, dont des gènes pro-apoptotiques comme Bax, Bid,... De plus, p53 est capable de réguler négativement l'expression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2. L'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN peut également passer par une voie indépendante de p53. En effet, les kinases effectrices phosphorylent également le facteur de transcription E2F. Cela a pour conséquence l'augmentation d'expression de gènes pro-apoptotiques comme APAF-1 et les pro-caspases (Melet et al., 2008).

La voie extrinsèque peut également être touchée par les agents chimiothérapeutiques. En effet, l'expression de Fas (CD95) peut être induite d'une manière p53-dépendante. De plus, FasL (CD95L) peut également être induit via la voie SAPK/JNK (stress-activated protein kinases/jun amino-terminal kinases). Ces deux évènements vont soit entraîner la mort de la cellule elle-même ou celle de ses voisines (Igney and Krammer, 2002).

L'une des caractéristiques des cancers est la dérégulation de l'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, il ne suffit pas d'avoir une prolifération dérégulée pour avoir le développement d'une tumeur, l'inhibition de la mort a également son importance (Igney and Krammer, 2002). Le problème est qu'avec une machinerie apoptotique dérégulée, des phénomènes de résistance aux traitements ciblant l'apoptose peuvent apparaître.

3. Résistance aux traitements

La résistance aux traitements anticancéreux est un réel problème et découvrir les mécanismes sous-jacents à cette résistance est d'un grand intérêt dans la recherche contre le cancer (Farrell, 2011).

La résistance aux traitements peut être présente avant le début de celui-ci, et est alors nommée résistance primaire ou intrinsèque. À l'opposé, la résistance secondaire ou acquise est due au traitement lui-même (Rebucci and Michiels, 2013). De plus, les mécanismes de résistance peuvent être classés en deux groupes : les mécanismes pharmacologiques et les mécanismes cellulaires (Lage, 2008).

Les mécanismes pharmacologiques entraînent un dosage de la drogue au niveau de la tumeur insuffisant pour qu'il y ait une réponse à la chimiothérapie. Cela est dû à plusieurs choses. D'une part, la toxicité vis-à-vis des tissus normaux limite la dose d'agents chimiothérapeutiques pouvant être administrée de manière systémique à un individu. D'autre part, un certain nombre de facteurs joue sur la quantité d'agent chimiothérapeutique atteignant les cellules tumorales, comme les facteurs pharmacocinétiques, l'activation métabolique, le microenvironnement tumoral... (Holohan et al., 2013).

Les mécanismes cellulaires sont quant à eux mis en place par les cellules tumorales avec pour but la survie cellulaire. Ils peuvent jouer sur le transport et le métabolisme des médicaments, sur leurs cibles, sur les mécanismes de réparation de l'ADN, mais aussi sur l'apoptose.

En ce qui concerne le transport des médicaments, la famille des ABC (ATP-binding cassette) transporteurs est d'une grande importance dans l'efflux des médicaments hors des cellules. Cette famille est composée de 48 membres chez l'humain et comprend notamment la P-glycoprotéine (encodée par le gène ABCB1). L'expression de certains de ces transporteurs est souvent augmentée chez des patients ne répondant pas à la chimiothérapie (Wu et al., 2014). Les trois membres de cette famille les plus étudiés sont la P-glycoprotéine, le transporteur MRP1 (MDR-associated protein 1 ; encodé par le gène ABCB1) et le transporteur BCRP (breast cancer resistance protein ; encodé par ABCG2) (Holohan et al., 2013). L'action de ces transporteurs est de faire sortir la drogue des cellules ce qui fait que la quantité intracellulaire reste faible, et n'engendre pas de dommages cellulaires (Rebucci and Michiels, 2013).

La réponse finale ciblée par les agents chimiothérapeutiques est principalement la mort des cellules par apoptose. Seulement, l'apoptose est souvent dérégulée dans les cellules tumorales ce qui fait que les cellules survivent aux traitements (Holohan et al., 2013). Les stratégies tumorales pour contourner l'apoptose peuvent être classées en deux groupes : la surexpression de protéines anti-apoptotiques et l'inactivation de gènes pro-apoptotiques comme l'altération de la voie p53 (Rebucci and Michiels, 2013).

Le problème pour le patient est que les cellules sont souvent résistantes à plus d'un agent chimiothérapeutique, même si les différents agents impliqués ont des structures, des cibles et

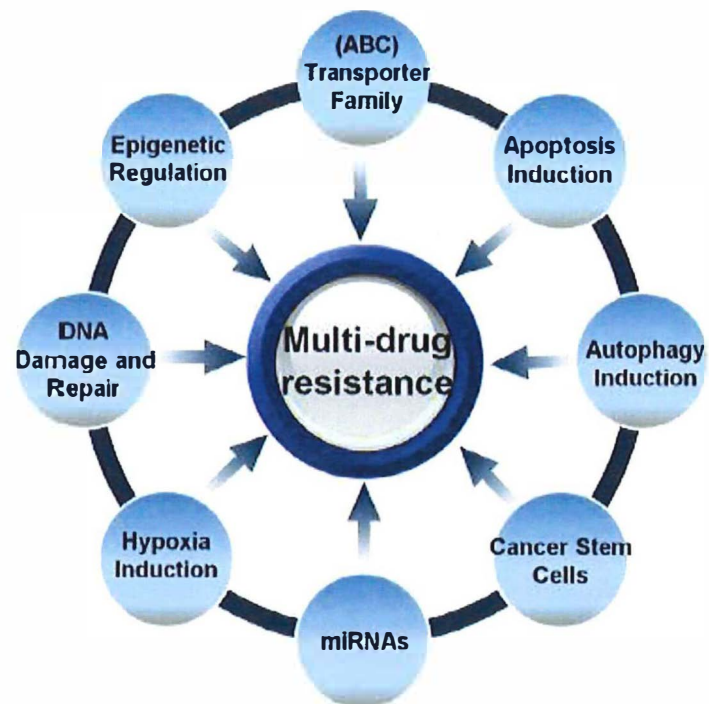


Figure I-14 : Mécanismes potentiels de résistance multiple. (Wu et al., 2014)

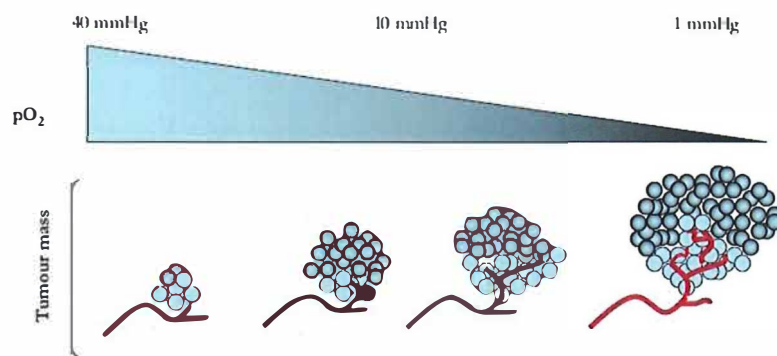


Figure I-15 : Croissance tumorale et pression partielle en oxygène. (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2006)

des mécanismes d'action différents. Ce phénomène est repris sous le terme de « résistance multiple » (en anglais : multi-drug resistance (MDR)). Différents mécanismes peuvent intervenir dans cette résistance multiple (Figure I-14) (Wu et al., 2014). De plus, la masse tumorale est constituée d'une population hétérogène de cellules d'un point de vue moléculaire et génétique. Cela fait que la résistance à un traitement peut être le résultat de la sélection d'une minorité de la population cellulaire tumorale (Holohan et al., 2013).

Le microenvironnement tumoral joue un rôle non négligeable dans l'apparition de phénomènes de résistance à la radio- et la chimiothérapie. Les tumeurs ne sont pas seulement composées de cellules tumorales. En effet, elles sont également composées de cellules stromales, comme des fibroblastes et des cellules inflammatoires. Le microenvironnement tumoral est aussi caractérisé par la présence de zones hypoxiques. Ces différents éléments du microenvironnement ont un impact sur la résistance des cellules cancéreuses aux traitements (Tredan et al., 2007).

4. L'hypoxie

4.1. Généralités

L'hypoxie correspond à la diminution de la pO_2 normale au niveau des tissus. Elle apparaît lorsque les tissus sont en présence d'une pO_2 de 10 mmHg ou inférieure (Harrison and Blackwell, 2004). L'hypoxie peut être systémique ; cela peut être dû à une diminution du contenu en oxygène du sang. C'est le cas lorsqu'un individu se trouve en altitude ou encore lors d'une importante perte de sang (Semenza, 2009). À côté de ça, l'hypoxie peut être plus localisée, comme lors d'un infarctus du myocarde ou dans le cas d'une tumeur.

L'hypoxie est une caractéristique retrouvée dans un grand nombre de tumeurs solides. En effet, lors de la croissance tumorale, les cellules centrales se retrouvent éloignées des vaisseaux sanguins et sont alors au-delà de la distance de diffusion de l'oxygène (Figure I-15), qui est limitée à environ 150 μm dans les tissus (Brahimi-Horn et al., 2007). Ces cellules deviennent alors hypoxiques. De plus, le réseau vasculaire des tumeurs est anormal et le flux sanguin peut y être perturbé. Cela participe également à l'apparition de régions hypoxiques au sein d'une tumeur (Harris, 2002).

4.2. Adaptation à l'hypoxie

Tout d'abord, l'hypoxie peut induire des adaptations systémiques de l'organisme afin de maintenir l'homéostasie de l'oxygène. Au niveau de l'organisme, l'hypoxie est ressentie par des cellules chimioréceptrices ce qui a un impact sur la ventilation pulmonaire et sur le système cardiovasculaire (Michiels, 2004). De plus, des cellules spécialisées du rein répondent à l'hypoxie systémique en produisant l'érythropoïétine, ce qui permet la différenciation des progéniteurs de globules rouges (Semenza, 2009).

À côté de ces adaptations systémiques, des adaptations cellulaires vont apparaître en cas d'hypoxie. D'une part, il y a les adaptations du métabolisme avec des protéines déjà présentes. Les cellules doivent maintenir des niveaux élevés en ATP pour survenir à leurs besoins en énergie. La production d'ATP passe principalement par la mitochondrie avec la nécessité d'oxygène. En cas d'hypoxie, la cellule va s'orienter vers un métabolisme anaérobie en utilisant la glycolyse comme source d'énergie. Bien que celle-ci ait un plus faible rendement, celui-ci peut être augmenté si une quantité suffisante de glucose est amenée à la cellule. De

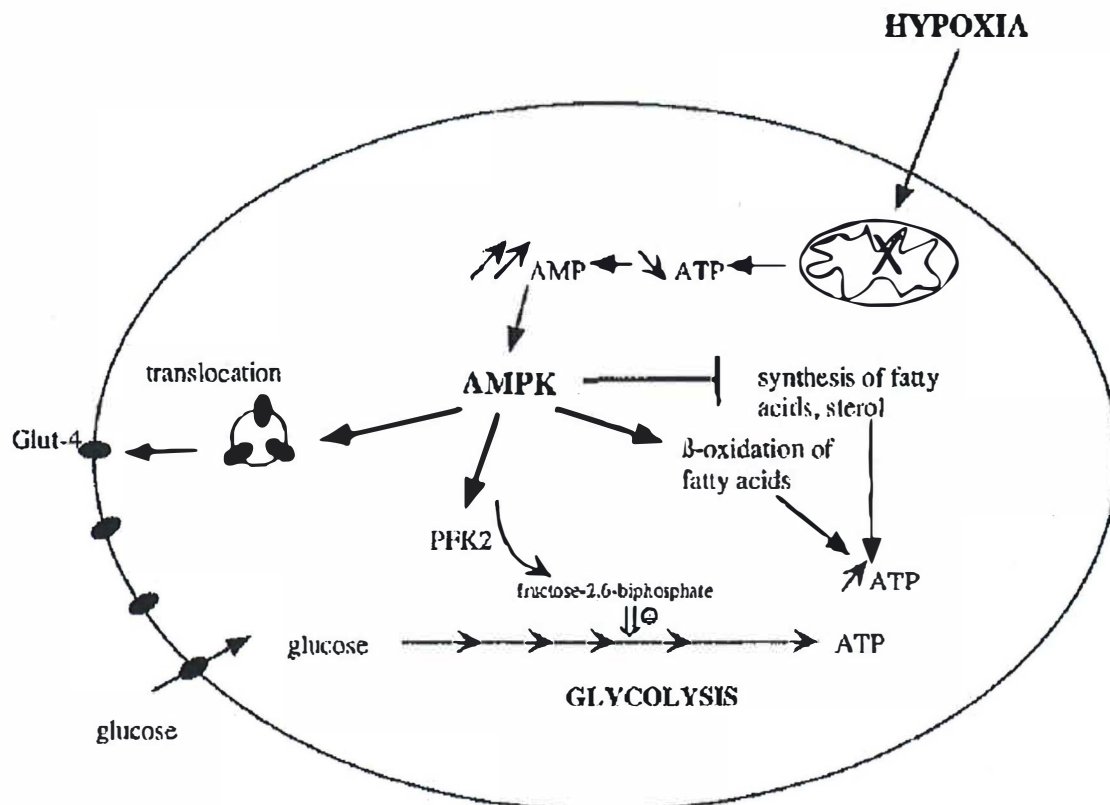


Figure I-16 : Adaptation à l'hypoxie passant par l'AMPK. (Michiels, 2004)

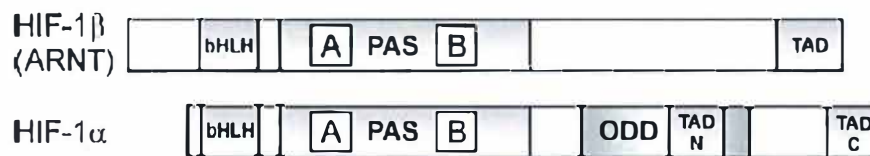


Figure I-17 : Structure de HIF-1α et de HIF-1β. HIF-1α et HIF-1β sont constitués d'un domaine basic loop-helix-loop (bHLH) et d'un domaine PAS. HIF-1β possède un domaine de transactivation (TAD) alors qu'HIF-1α en possède deux (TAD N et TAD C). De plus, HIF-1α possède un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD). (Hopfl et al., 2004)

plus, la quantité diminuée d'ATP, ressentie par l'AMPK, dans les cellules hypoxiques oriente le métabolisme vers le catabolisme qui produit de l'ATP plutôt que vers l'anabolisme qui en consomme (Figure I-16). Certains processus consommant de l'ATP sont nécessaires à la survie cellulaire comme la pompe Na^+/K^+ . Afin de survivre, la cellule organise ses processus consommateurs d'énergie en une hiérarchie. D'autre part, des facteurs de transcription spécifiques sont activés, les HIFs (hypoxia-inducible factors). Ces facteurs augmentent l'expression de gènes qui codent pour des protéines permettant à la cellule de s'adapter aux conditions de faible disponibilité en oxygène (Gordan and Simon, 2007).

Lorsque des cellules tumorales sont en hypoxie, une des principales réponses à cette condition est l'induction de l'angiogenèse (Brahimi-Horn et al., 2007). Celle-ci est due à l'induction de différents gènes dont celui codant pour le VEGF (vascular endothelial growth factor). Ces différents éléments induits ont un effet sur les cellules constituant l'endothélium et des nouveaux vaisseaux sont construits à partir de ceux existant (Semenza, 2009). Le problème de ces néovaisseaux est qu'ils sont déformés et irréguliers. De ce fait, la distribution de l'oxygène et des nutriments n'est pas optimale et donc la région vascularisée par ce nouveau vaisseau reste hypoxique (Brahimi-Horn et al., 2007). De plus, les cellules cancéreuses hypoxiques vont subir différents changements métaboliques ce qui leur permet de survivre, de proliférer mais aussi de devenir plus résistantes aux traitements conventionnels.

4.3. Les facteurs de transcription HIFs

Les HIFs sont des facteurs de transcription fonctionnant sous forme d'hétérodimère constitué de deux protéines de la famille PAS (famille Per-ARNT-Sim) : une sous-unité α et une sous-unité β (Weidemann and Johnson, 2008).

Trois formes de la sous-unité α , encodées par un locus génique différent sont connues (HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α). Alors que HIF-1 α est exprimé de manière ubiquitaire, HIF-2 α et HIF-3 α sont exprimés dans des tissus spécifiques (Bertout et al., 2008). D'un point de vue fonctionnel, HIF-1 α et HIF-2 α semblent avoir des fonctions non redondantes. Par contre, il semble qu'HIF-3 α fonctionne comme un régulateur négatif en formant un hétérodimère transcriptionnellement inactif avec HIF-1 α (Weidemann and Johnson, 2008). En ce qui concerne la sous-unité β , la plus connue est HIF-1 β aussi connu sous le nom d'ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) qui est exprimée de manière ubiquiste comme HIF-1 α . A côté de celui-ci, il y a ARNT2 qui peut le substituer ; il est exprimé de manière restreinte à certains tissus, et ARNT3 qui ne semble pas intervenir dans la réponse hypoxique (Hopfl et al., 2004).

4.4. HIF-1

○ Structure

HIF-1 fait partie de la famille des HIFs et est donc constitué d'une sous-unité α (HIF-1 α) et d'une sous-unité β (HIF-1 β). D'un point de vue structurel, ces deux sous-unités possèdent un domaine PAS et un domaine bHLH (basic helix-loop-helix) (Figure I-17). Ces deux domaines participent à la dimérisation (Semenza, 2003). HIF-1 α est également composé de deux domaines de transactivation (C-TAD et N-TAD). Ceux-ci permettent le recrutement de co-activateurs, comme CBP (CREB-binding protein) ou p300 (adenovirus E1A-associated 300-kDa protein), ce qui a son importance pour la transcription des gènes cibles. C'est au niveau de ces domaines de transactivation que des modifications post-traductionnelles d'HIF-1 α peuvent survenir. De plus, HIF-1 α comprend un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène

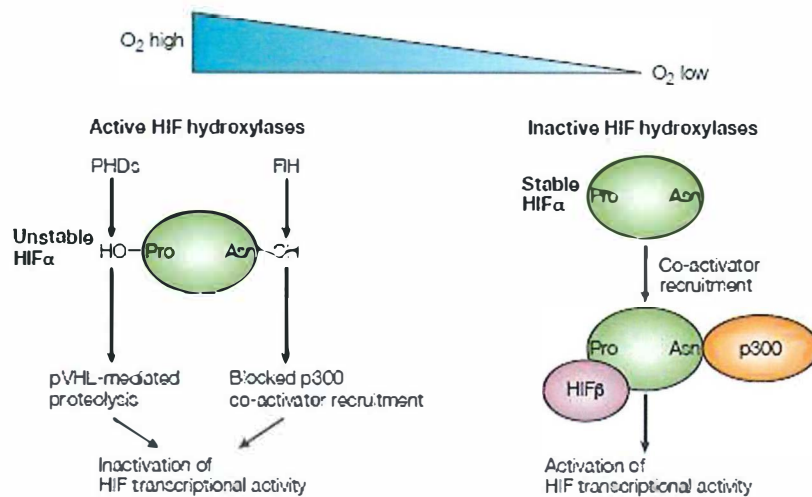


Figure I-18 : HIF-1α en présence et en absence d'oxygène. (Schofield and Ratcliffe, 2004)

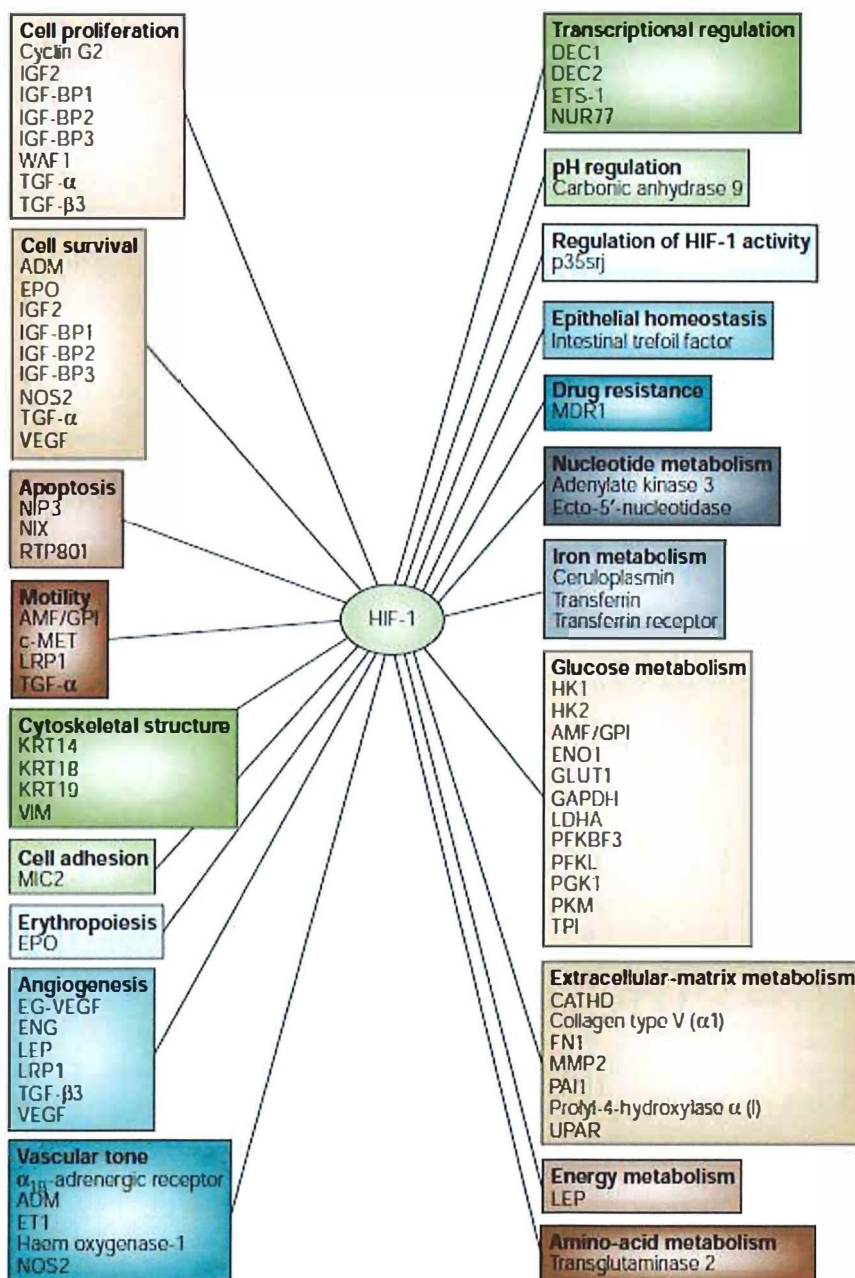


Figure I-19 : Gènes cibles de HIF-1. (Semenza, 2003)

(ODDD) qui intervient dans la régulation de la stabilité de la protéine (Hopfl et al., 2004). En effet, alors que HIF-1 β est exprimé de manière constitutive, l'expression de HIF-1 α est très régulée. Bien que les niveaux en ARN_m (ARN messenger) de HIF-1 α soient stables, ses niveaux protéiques varient en fonction des conditions. En présence d'oxygène, HIF-1 α est dégradé ce qui fait que c'est cet élément qui répond à l'hypoxie (Semenza, 2003). C'est le niveau protéique de HIF-1 α qui détermine la liaison de HIF-1 à l'ADN et donc l'activité transcriptionnelle de celui-ci (Quintero et al., 2004).

○ **En normoxie**

En présence d'oxygène, HIF-1 α a une courte demi-vie et est très peu présent dans les cellules. En effet, une fois synthétisée, cette sous-unité est rapidement dégradée, par des mécanismes qui dépendent de l'oxygène (Weidemann and Johnson, 2008). Néanmoins, il est possible de trouver des niveaux plus importants d'HIF-1 α en normoxie. Cela arrive en réponse à des facteurs de croissance, de cytokines qui vont augmenter la synthèse de HIF-1 α . Cette réponse est dépendante du type cellulaire. Plus un tissu contient de cellules, plus la consommation en oxygène est importante et l'homéostasie de l'oxygène est essentielle. Il n'est donc pas étonnant que la réponse aux signaux de croissance et de survie passe par HIF-1 α (Semenza, 2003).

Hydroxylation de deux prolines

HIF-1 α , une fois synthétisé et en présence d'oxygène, subit rapidement l'hydroxylation de deux prolines (Pro⁴⁰² et Pro⁵⁶⁴) (Figure I-18). Celles-ci se situent au niveau de l'ODDD (Ke and Costa, 2006). Ces hydroxylation sont l'œuvre d'une famille d'enzymes, les PHD (prolyl hydroxylase), constituées de trois isoformes. Ces enzymes sont des dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate (2-OG). D'une manière générale, les dioxygénases catalysent des réactions où les deux atomes d'oxygène sont transférés aux produits (Schofield and Ratcliffe, 2004). L'hydroxylation qu'elles catalysent nécessite de l'oxygène (O₂) et des cofacteurs, le fer (Fe²⁺) et l'ascorbate. L'oxygène moléculaire est scindé en deux atomes d'oxygène. L'un est transféré au résidu proline et l'autre génère du succinate et du dioxyde de carbone en réagissant avec le 2-OG. Le fait que les PHD nécessitent de l'oxygène pour catalyser leur réaction sur HIF-1 α fait de ces enzymes les senseurs de l'oxygène (Ke and Costa, 2006).

Interaction avec pVHL

Une fois hydroxylées, les deux prolines de l'ODDD de HIF-1 α sont reconnues par pVHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein) (Figure I-18) (Wenger, 2002). Du fait que pVHL fait partie d'un complexe multiprotéique E3 ubiquitine ligase, des ubiquitines sont attachées de manière covalente à HIF-1 α . L'ubiquitination d'une protéine étant un signal pour sa dégradation par le protéasome, HIF-1 α est dégradé (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2006).

Hydroxylation d'une asparagine

Une autre manière d'empêcher HIF-1 α de fonctionner en présence d'oxygène est de jouer sur ses domaines de transactivation. En effet, la stabilisation de HIF-1 α seule n'est pas suffisante pour l'activation transcriptionnelle complète de HIF-1 (Ke and Costa, 2006). C'est à nouveau un phénomène d'hydroxylation qui intervient, mais cette fois d'un résidu asparagine du C-TAD (Asn⁸⁰³) (Figure I-18). L'enzyme responsable est à nouveau une dioxygénase dépendante du 2-OG, FIH-1 (factor inhibiting HIF-1). Cette hydroxylation empêche l'interaction de HIF-1 α avec ses co-activateurs comme CBP/p300. De plus, cette enzyme est capable de fonctionner à des

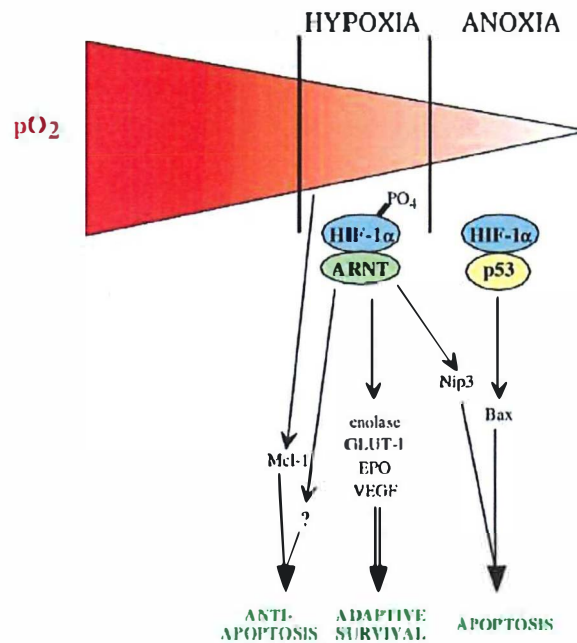


Figure I-20 : Effets pro- ou anti-apoptotiques de l'hypoxie. (Piret et al., 2002)

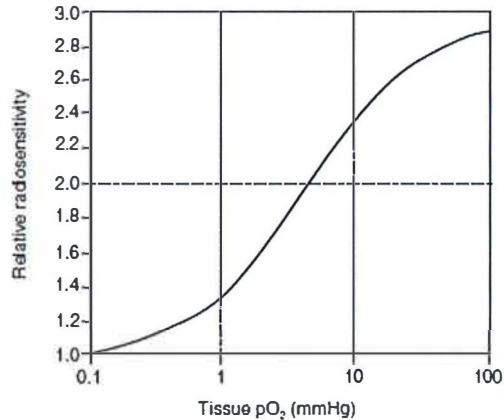


Figure I-21 : Relation entre la pression partielle en oxygène et la radiosensibilité. (Harrison and Blackwell, 2004)

concentrations en oxygène plus faibles que les PHD. Cela veut donc dire que FIH-1 peut être actif alors que les PHD ne le sont plus et donc HIF-1 α stabilisé. Cela permet une modulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Kaelin, 2008).

○ **En hypoxie**

En absence d'oxygène, les PHD ne sont plus capables d'hydroxyler les résidus prolines d'HIF-1 α ce qui fait que pVHL n'est pas recruté (Figure I-18). De ce fait, il n'y a plus d'hydroxylation des résidus prolines et donc l'interaction de pVHL avec HIF-1 α n'est plus favorisée. HIF-1 α n'est donc plus envoyé vers le protéasome pour être dégradé, il est stabilisé. Cela engendre son accumulation qui est observée rapidement dans les cellules exposées à une hypoxie (Ke and Costa, 2006). HIF-1 α peut alors transloquer dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (Wenger, 2002). Une fois dans le noyau, HIF-1 α se lie à HIF-1 β qui y est déjà présent. L'hétérodimère HIF-1 est ainsi formé. HIF-1 reconnaît une séquence particulière au niveau de ses gènes cibles, la séquence HRE (hypoxia response element) (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2006). De la même manière que pour la PHD, FIH ne sait plus hydroxyler l'asparagine du C-TAD en absence d'oxygène. Cela a pour conséquence l'interaction de HIF-1 α avec ses co-activateurs, tels que CBP/p300 et donc l'activation de la transcription des gènes cibles de HIF-1 (Ke and Costa, 2006).

○ **Gènes cibles de HIF-1**

Les gènes cibles de HIF-1 sont nombreux et interviennent dans différents processus cellulaires, comme la prolifération, le métabolisme, l'apoptose,... (Figure I-19). Certains gènes cibles de HIF-1 sont exprimés en réponse à l'hypoxie dans la plupart des types cellulaires. C'est le cas notamment du VEGF. Par contre, d'autres ne le sont que dans certains types cellulaires, comme l'érythropoïétine (Semenza, 2003).

○ **HIF-1 et apoptose**

En fonction des situations, HIF-1 peut être pro- ou anti-apoptotique. Lorsque des cellules sont exposées à une hypoxie chronique ou sévère, l'apoptose peut être ciblée. Cela est dû au fait que les adaptations induites par HIF-1 ne sont pas suffisantes pour maintenir la survie cellulaire. D'une part, HIF-1 peut induire l'expression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bnip3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3). D'autre part, HIF-1 α interagit avec p53 ce qui a pour effet la stabilisation de p53 et l'inhibition de la transcription dépendante de HIF-1. Une fois stabilisé, p53 induit l'expression de ses gènes cibles dont ceux impliqués dans l'apoptose. À côté de cette induction de l'apoptose, l'hypoxie peut également la supprimer, d'une manière dépendante ou indépendante de HIF-1. D'une manière générale, il peut être dit que l'hypoxie est pro-apoptotique lorsque HIF-1 α interagit avec p53 et anti-apoptotique lorsqu'il se dimérise avec HIF-1 β . L'interaction de HIF-1 α avec p53 plutôt qu'avec HIF-1 β peut être expliquée par l'état de phosphorylation de HIF-1 α (Figure I-20) (Piret et al., 2002).

4.5. Hypoxie et traitements anticancéreux

Via divers mécanismes dont beaucoup sont encore inconnus, l'hypoxie peut réduire l'efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie.

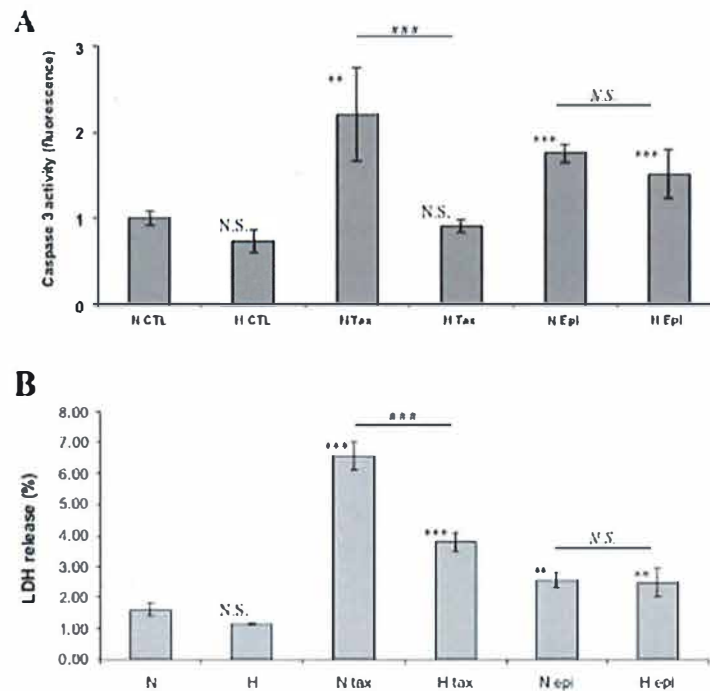


Figure I-22 : Effet de l'hypoxie sur la mort induite par le paclitaxel ou l'épirubicine sur les cellules MDA-MB-231. (A) Mesure de l'activité caspase-3 dans des cellules MDA-MB-23 incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H), en présence de paclitaxel (tax ; 50 μ M) ou d'épirubicine (epi ; 10 μ M). (B) Mesure du relargage de LDH dans des cellules MDA-MB-23 incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H), en présence de paclitaxel (tax ; 50 μ M) ou d'épirubicine (epi ; 10 μ M). (Flamant et al., 2012)

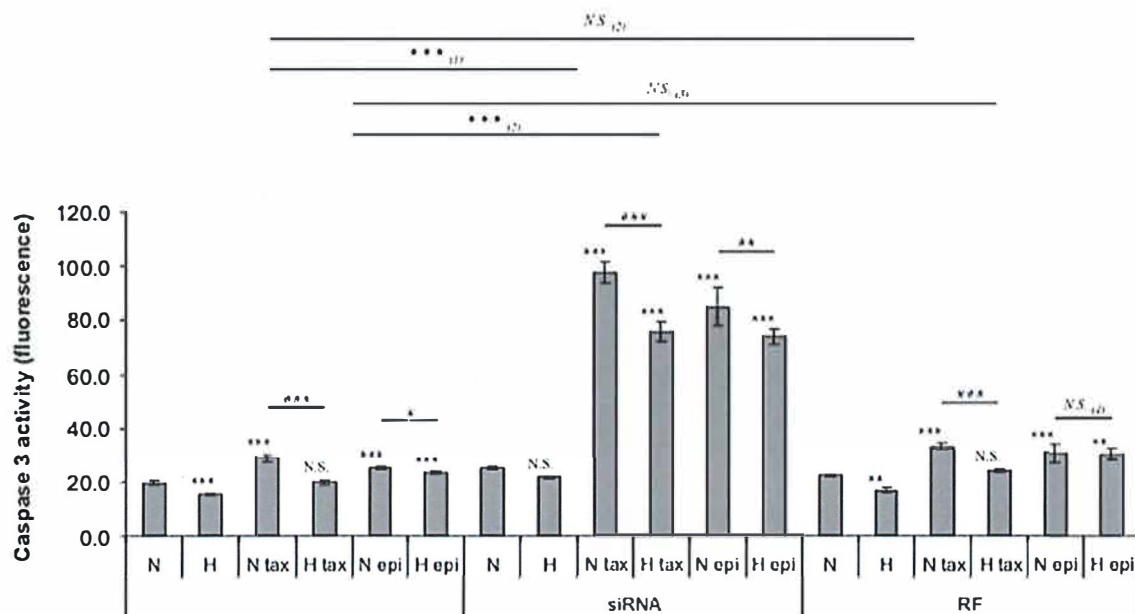


Figure I-23 : Effet du silencing de TMEM45A. Mesure de l'activité caspase-3 de cellules MDA-MB-231 transfectées avec un siRNA ciblant TMEM45A (siRNA) ou risk-free (RF), incubées en normoxie (N) ou en hypoxie (H), en présence de paclitaxel (tax ; 50 μ M) ou d'épirubicine (epi ; 10 μ M). (Flamant et al., 2012)

La sensibilité des cellules tumorales à la radiothérapie diminue rapidement avec la diminution de la pO_2 (Figure I-21). Cela peut s'expliquer par le fait que les dommages à l'ADN augmentent en présence d'oxygène. D'un autre côté, l'hypoxie induit des changements qui entraînent une apoptose diminuée ou encore une augmentation des enzymes de réparation ce qui participe également à la radiorésistance (Harrison and Blackwell, 2004).

Une manière d'expliquer la chimiorésistance est de se baser sur les causes de l'hypoxie au sein d'une masse tumorale : le flux sanguin anormal et la distance par rapport aux capillaires sanguins. Comme les agents chimiothérapeutiques sont amenés au niveau des cellules tumorales par la circulation sanguine, ceux-ci sont mal distribués au niveau de la tumeur et donc leur efficacité diminue. De plus, l'action de certains agents chimiothérapeutiques nécessitent la présence d'oxygène. Enfin, comme pour la radiorésistance, les changements adaptatifs induits par l'hypoxie ont également un rôle dans la chimiorésistance (Cosse and Michiels, 2008). La résistance observée en hypoxie dépend d'une part de la lignée cellulaire cancéreuse. En effet, alors que les cellules A549 et MCF-7 meurent en présence d'étoposide aussi bien en normoxie qu'en hypoxie, une résistance à la mort est observée pour les cellules HepG2 incubées en présence d'étoposide en hypoxie (Cosse et al., 2007). La résistance observée en hypoxie dépend également de l'agent chimiothérapeutique utilisé (voir ci-dessous).

5. TMEM45A (transmembrane protein 45A)

5.1. Découverte de son implication dans le phénomène de résistance induit par l'hypoxie

L'équipe de Carine Michiels (Flamant et al., 2012) s'est intéressée à l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose induite par le paclitaxel ou l'épirubicine au niveau de cellules de cancer du sein humain, les cellules MDA-MB-231. Lorsque ces cellules étaient incubées en normoxie en présence de l'un de ces agents chimiothérapeutiques, il a été observé qu'elles mouraient par apoptose. En effet, une augmentation du relargage de la LDH (lactate déshydrogénase) (évaluant la cytotoxicité) et de l'activité caspase-3 (évaluant l'activation de l'apoptose) a été observée. Cependant en hypoxie, les observations n'étaient pas les mêmes. En effet, alors qu'aucun changement n'était observable pour les cellules incubées en présence d'épirubicine en hypoxie ou en normoxie, une diminution du relargage de la LDH et de l'activité caspase-3 était observée pour les cellules incubées en présence de paclitaxel en hypoxie (Figure I-22).

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans ce phénomène d'inhibition de l'apoptose, une analyse transcriptomique a été réalisée à partir d'extraits d'ARN de cellules contrôles et de cellules incubées en présence de chacun de ces deux agents en normoxie ou en hypoxie. Différents gènes ont été montrés comme régulés positivement dans les cellules incubées en présence de paclitaxel en hypoxie par rapport aux cellules incubées en normoxie, dont des gènes connus comme étant des cibles de HIF-1. Les niveaux d'ARN_m d'un gène étaient particulièrement augmentés (plus de 16 fois) dans les cellules mises en présence de paclitaxel et incubées en hypoxie par rapport aux cellules incubées en présence de paclitaxel en normoxie, le gène TMEM45A. Par une PCR en temps réel, il a été montré que l'expression de ce gène était augmentée en hypoxie, en hypoxie en présence de paclitaxel, mais pas en hypoxie en présence d'épirubicine. En utilisant un siRNA ciblant HIF-1 α , une diminution de la surexpression de TMEM45A en hypoxie a été observée (Flamant et al., 2012). Cela est cohérent avec le fait que TMEM45A ait été décrit comme un gène cible de HIF-1 (Benita et al., 2009).

Afin de voir l'implication de TMEM45A dans le phénomène de résistance induit par l'hypoxie, les cellules MDA-MB-231 ont été transfectées avec un siRNA ciblant TMEM45A avant d'être

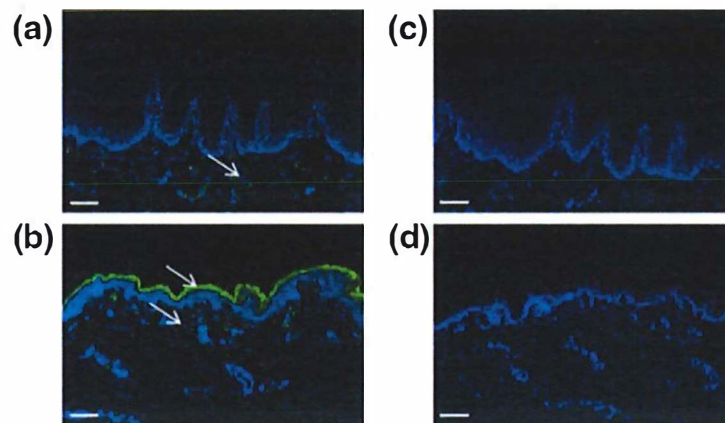


Figure I-24 : Expression de TMEM45A dans un épithélium kératinisé ou non. Marquage en immunofluorescence de TMEM45A (en vert) dans un épithélium normal humain non kératinisé de la bouche (**a** et **c**) dans la peau humaine normale (**b** et **d**). Les contrôles négatifs se trouvent en **c** et **d**. (Hayez et al., 2014)

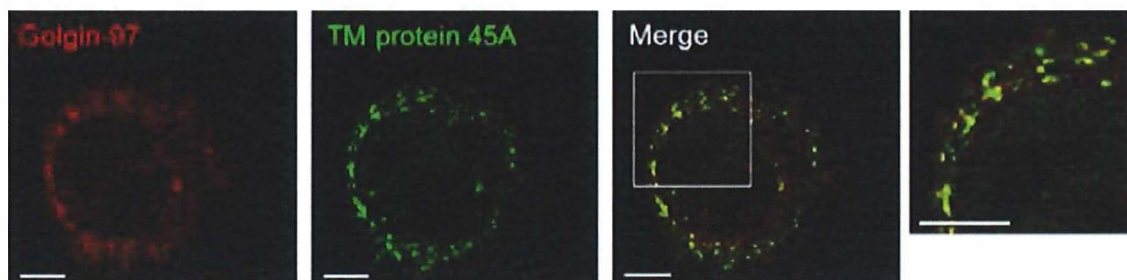


Figure I-25 : Co-localisation entre TMEM45A et golgin-97 dans des kératinocytes épidermiques humains normaux. La golgin-97 apparaît en rouge, TMEM45A en vert, et le signal jaune correspond à la co-localisation entre ces deux protéines. (Hayez et al., 2014)

incubées en normoxie ou en hypoxie en présence de paclitaxel. Lorsque ces cellules étaient transfectées avec le siRNA ciblant TMEM45A et incubées en hypoxie en présence de paclitaxel, une augmentation de l'activité caspase-3 a été observée (Figure I-23). Les mêmes résultats ont été obtenus dans le cas de cellules de carcinome hépatocellulaire, les cellules HepG2, incubées en présence d'étoposide en hypoxie. D'un point de vue clinique, la faible expression de TMEM45A au sein d'une tumeur est associée à une meilleure survie sans rechute que lorsque des taux plus élevés de TMEM45A sont observés (Flamant et al., 2012).

Ces différents résultats suggèrent donc que TMEM45A est nécessaire à la protection amenée par l'hypoxie contre l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques.

5.2. Quid de TMEM45A ?

Le gène TMEM45A code pour la protéine TMEM45A, aussi connue sous DERP7 (dermal papilla-derived protein 7), dont le rôle est inconnu. Ce gène se trouve sur le chromosome 3 avec six exons codants et appartient à la famille de gènes TMEM. Cette protéine contient le domaine Pfam DUF716 (domain of unknown function 716) qui est associé à une infection virale des plantes. Le gène de TMEM45A a sept variants transcriptionnels, dont trois donnent une protéine : une de 191 acides aminés avec un poids moléculaire de 21,9 kDa, une de 275 acides aminés avec un poids moléculaire de 31,7 kDa et une de 291 acides aminés avec un poids moléculaire de 33,5 kDa (Ensembl).

En opposition avec les découvertes de Flamant et al décrites ci-dessus, la sous-expression de TMEM45A est en faveur de la progression du DCIS (ductal carcinoma in situ) en cancer du sein invasif (Lee et al., 2012). TMEM45A a été découvert comme faisant partie des gènes associés à la peau, les SAGs (skin associated genes), dans le groupe des protéines membranaires intégrales, et étant exprimé dans les kératinocytes primaires humains, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Gerber et al., 2013).

Hayez et al se sont intéressés à la présence de TMEM45A dans la peau et les kératinocytes (Hayez et al., 2014). L'expression de TMEM45A a été trouvée comme augmentée dans des kératinocytes post-confluents, avec un profil d'expression similaire aux profils d'expression de marqueurs de la différenciation (kératine 10 et involucrine). De plus, il a été montré que l'expression de TMEM45A est plus importante dans la couche granulée de l'épiderme, où se trouvent des kératinocytes plus différenciés que dans les couches inférieures. D'un point de vue fonctionnel, TMEM45A pourrait être impliqué dans le processus de kératinisation. En effet, l'expression de TMEM45A n'est pas retrouvée au niveau d'un épithélium non kératinisé (Figure I-24). La localisation cellulaire de TMEM45A a également été évaluée. Les résultats ont démontré la présence de TMEM45A au niveau de l'appareil de Golgi, et plus précisément sur le réseau trans-golgien (Figure I-25).

5.3. TMEM205, un autre gène encodant une protéine membranaire, associé à un phénomène de résistance

À partir d'une librairie d'ADN_c (ADN complémentaire) venant d'une lignée cellulaire résistante à la cisplatine (lignée cellulaire de carcinome épidermoïde KB-3-1 (sous-clone des HeLa) et ses dérivés résistants à la cisplatine, KB-CP.3 et KB-CP.5), TMEM205 a été identifié comme pouvant participer à ce phénomène de résistance. Le niveau d'expression de cette protéine a été étudié au niveau des tissus et il a été montré que l'expression est plus importante au niveau de tissus avec une fonction sécrétoire (rein, pancréas, foie,...). De plus, il a été montré

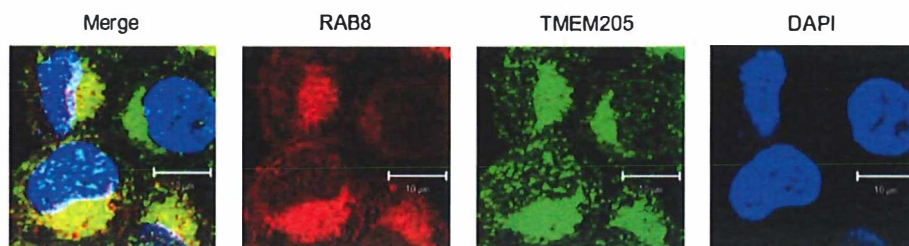


Figure I-26 : Co-localisation de TMEM205 et de Rab8 dans des cellules résistantes pour la cisplatine (KB-CP). En rouge, Rab8 ; en vert, TMEM205 ; en jaune, co-localisation de Rab8 et TMEM205 ; en bleu, noyaux. (Shen and Gottesman, 2012)

que les niveaux d'expression protéique de TMEM205 sont corrélés avec les niveaux de résistance à la cisplatine, principalement pour les stades précoces de résistance. Cette protéine est une protéine membranaire de surface mais sa distribution cellulaire peut changer en fonction du niveau de résistance à la cisplatine. En effet, alors qu'elle se trouve en surface dans des cellules sensibles à la cisplatine, elle est retrouvée au niveau du réseau trans-golgien se trouvant à proximité du noyau dans des cellules résistantes. En transfectant des cellules sensibles à la cisplatine avec un vecteur contenant TMEM205, il a été montré que ces cellules survivent mieux à la présence de cisplatine que les cellules contrôles. De plus, dans ces mêmes cellules transfectées, une plus faible accumulation de cisplatine est observée, suggérant que l'action de TMEM205 sur le phénomène de résistance à la cisplatine pourrait être au niveau d'un phénomène de sécrétion (Shen et al., 2010).

La co-localisation de TMEM205 avec des protéines de l'appareil de Golgi a été évaluée. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la sécrétion, le trafic des vésicules et des organites et l'exocytose. Une co-localisation entre TMEM205 et Rab8 (Ras-related protein 8), une GTPase impliquée dans le recyclage endosomal, a été observée, proche du noyau (Figure I-26). De plus, TMEM205 ne co-localise pas avec VAMP3 (vesicle-associated membrane protein 3), un marqueur des endosomes tardifs, ce qui suggère que TMEM205 se trouve au niveau d'endosomes précoces. L'expression de Rab8 est augmentée dans les cellules résistantes à la cisplatine, d'une manière similaire à TMEM205. Au niveau de la cellule, la cisplatine est retrouvée dans des petites vésicules en périphérie du noyau. Cette localisation correspond à celle de TMEM205 et de Rab8. De ces observations, une hypothèse a été formulée : TMEM205 pourrait participer à la séquestration de la cisplatine dans des vésicules et Rab8 faciliterait le trafic de ses vésicules et leur exocytose (Shen and Gottesman, 2012).

Objectifs

Les traitements anticancéreux comme la chimiothérapie et la radiothérapie font souvent face à des mécanismes de résistance des cellules cancéreuses aux effets qu'ils induisent, notamment la mort cellulaire. Au vu de ces résistances, l'échec du traitement est fréquemment rencontré en pratique clinique. Les mécanismes de résistance sont multiples et différents facteurs interviennent dans l'apparition de ceux-ci, dont l'hypoxie. En étudiant la résistance en hypoxie de cellules cancéreuses à la mort induite par un agent chimiothérapeutique, il a été montré que TMEM45A, une protéine transmembranaire dont les fonctions sont encore inconnues, est surexprimé dans ces conditions. De plus, l'inhibition de l'expression de TMEM45A permet de contrer cette résistance apparaissant en hypoxie. Les informations concernant TMEM45A étant peu nombreuses, une souris knockout (KO) pour cette protéine a été générée. À partir de celle-ci, différentes expériences ont été réalisées afin d'accroître nos connaissances sur les fonctions de cette protéine.

Une première partie de ce travail a consisté en des expériences *in vitro* à partir de cellules dérivées de souris sauvage (TMEM45A^{+/+}) et knockout (TMEM45A^{-/-}) pour TMEM45A. Le modèle cellulaire choisi correspond aux fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs (mouse embryonic fibroblasts)). Ce type cellulaire est connu comme étant un outil intéressant pour l'étude de la fonction cellulaire et des mécanismes moléculaires de gènes d'intérêt par la comparaison de MEFs mutants et de MEFs sauvage (Wu et al., 2004).

À partir de ces MEFs, nous avons tout d'abord analysé l'expression de TMEM45A dans les différents génotypes. Ensuite, l'un des objectifs principaux de ce travail était de confirmer les résultats obtenus par Flamant et al. Ces chercheurs ont montré que TMEM45A est impliqué dans un phénomène de résistance en condition d'hypoxie des cellules MDA-MB-231 et des cellules HepG2 à la mort induite par le paclitaxel ou l'étoposide respectivement (Flamant et al., 2012). Pour confirmer ces résultats, les MEFs ont été utilisés. En incubant ces cellules avec de l'étoposide ou de la doxorubicine, nous avons voulu vérifier si les MEFs TMEM45A^{-/-} sont plus sensibles à la mort induite par cet agent chimiothérapeutique que les MEFs TMEM45A^{+/+}.

À côté de ces expériences *in vitro*, des expériences *in vivo* ont également été réalisées afin de préciser la localisation de TMEM45A dans les différents organes. En effet, TMEM45A est connu pour être fortement exprimé dans la peau (Hayez et al., 2014), mais peu de choses sont connues quant à son expression dans les autres tissus. Pour cela, nous avons exploité la présence du gène LacZ codant pour la β -galactosidase dans le vecteur utilisé pour générer la souris KO. En fonction des résultats obtenus, des tests fonctionnels concernant les tissus où TMEM45A est trouvé comme exprimé pourront être envisagés.

II. MATERIEL ET METHODES

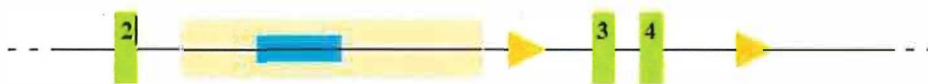


Figure II-1 : Schéma simplifié du vecteur utilisé pour invalider le gène TMEM45A. En vert, les 3 premiers exons du gène. En beige, la cassette. En bleu, la séquence du gène LacZ. En jaune, les séquences LoxP.

Tableau II-1 : Génotypage des souris – Matériel

Tampon de lyse 10x	100 mM de Tris-HCl pH8 (<i>Sigma</i> , USA)
	500 mM de KCl (<i>Merck</i> , GE)
	10% de Tween-20 (<i>Sigma</i> , USA) ou 1% de Triton-X100 (<i>Sigma</i> , USA)
Protéinase K 20 mg/ml (proteinase K from <i>Tritirachium album</i> , (<i>Sigma</i> , USA))	
DreamTaq + PCR Master Mix (<i>Thermo Scientific</i> , USA)	
Amorces	
DMSO (<i>Merck</i> , GE)	
Huile PCR (<i>Sigma</i> , USA)	
Agarose 2%	10 g d'agarose (<i>Promega</i> , USA)
	500 ml de tampon 1x
Tampon 1x	2% de TAE 50x
TAE 50x	242 g de Tris (<i>Sigma</i> , USA)
	100 ml de Na ₂ EDTA (<i>Sigma</i> , USA) 0,5 M pH 8
	57,1 ml d'acide acétique glacial (<i>Sigma</i> , USA)
	H ₂ O milliQ jusque 1 l
Bromure d'éthidium (<i>Sigma</i> , USA)	
O'Gene Ruler 100 bp (<i>Thermo Scientific</i> , USA)	
Centrifugeuse (Mikro 120 (<i>Hettich</i> , CH))	
Machine PCR (T100 Thermal Cycler (<i>BioRad</i> , USA))	

Tableau II-2 : Séquence des amorces PCR

LoxP	S	GTTCTACAACACACAGG
	AS	CTGAGTAGGCAGGG
Cre	S	ACATGTTTCAGGGATCGCCAG
	AS	CCTGTTTTGCACGTTCAACG
LacZ	S	AAGATCAGGATATGTGGCGG
	AS	AGAGGATGATGCTCGTGACG

Tableau II-3 : Mix PCR

Mix Cre et LacZ	10 µl de DreamTaq 1 µl de l'amorce sens 1 µl de l'amorce antisens 7 µl d'eau
Mix LoxP	10 µl de DreamTaq 0,75 µl de l'amorce sens 0,75 µl de l'amorce antisens 0,3 µl de DMSO 7,5 µl d'eau

1. Génération d'une souris déficiente pour TMEM45A

Afin d'étudier TMEM45A, une souris knockout a été générée (thèse d'Edith Roegiers). Pour cela, un vecteur (Figure II-1) a été transfecté dans des cellules ES, afin qu'il s'insère dans le génome au niveau de la séquence du gène de TMEM45A par recombinaison homologue. Ce vecteur contient une partie de la séquence du gène codant pour TMEM45A, ainsi qu'une cassette insérée entre le 2^{ème} et le 3^{ème} exon. La présence de cette cassette entraîne la traduction d'une protéine tronquée. Cependant, il est possible que TMEM45A soit exprimé. Pour contrer ce problème et être sûr de l'invalidation de TMEM45A, trois sites LoxP ont été ajoutés dans le vecteur. Le 1^{er} se trouve dans la cassette, le 2^{ème} juste après et le 3^{ème} après le 4^{ème} exon de TMEM45A. Chez des souris exprimant la Cre recombinase, le 3^{ème} et le 4^{ème} exon sont enlevés de la séquence et donc TMEM45A n'est plus exprimé. Afin d'obtenir des souris possédant le vecteur et exprimant la Cre recombinase, il est nécessaire de croiser une souris possédant le vecteur (hétérozygote ou KO) avec une souris exprimant la Cre recombinase. Finalement, le vecteur possède la séquence du gène LacZ au niveau de la cassette. Ce gène code pour la β -galactosidase et est sous la dépendance du promoteur de TMEM45A. Cela fait que lorsque le vecteur est présent, la β -galactosidase est exprimée là où TMEM45A l'est normalement et donc cela permet de localiser l'expression de TMEM45A dans les différents tissus de la souris.

2. Génotypage des souris (Tableau II-1)

Afin de génotyper les souris, un petit morceau de leur queue est coupé et mis dans un eppendorf avec 200 μ l de tampon de lyse 1x. L'échantillon est alors chauffé à 95°C pendant 5 minutes. 10 μ l de protéinase K sont alors ajoutés avant l'incubation de l'échantillon à 55°C jusqu'au lendemain. Après avoir été chauffé à 95°C, l'échantillon est centrifugé 2 min à vitesse maximale, dans le but de culoter les débris.

Trois PCR différentes (amorces différentes ; Tableau II-2) sont nécessaires pour connaître le génotype des MEFs. Les détails des informations obtenues pour chaque amorce se trouvent dans la partie « Résultats » à la page 29. Les trois mix PCR différents sont donc préparés pour le nombre voulu d'échantillons (Tableau II-3) et 19 μ l de ceux-ci sont mis dans les puits d'une plaque PCR. Ensuite, 1 μ l d'échantillon dilué 10x ou non est ajouté dans chaque puits. Pour le blanc, 1 μ l d'eau distillée est utilisé. Afin d'éviter l'évaporation du contenu des puits, une goutte d'huile minérale PCR est ajoutée dans chaque puits. Les étapes de la PCR sont les suivantes : 3' à 94°C ; 32 cycles comprenant 30'' à 94°C pour la dénaturation, 30'' à 57°C pour l'hybridation et 1' à 72°C pour l'élongation ; 10' à 72°C.

Une électrophorèse est réalisée afin de séparer les produits d'amplification de PCR selon leur poids moléculaire et donc selon leur taille. Cela permet leur visualisation et leur identification. Le gel d'électrophorèse est composé de 60 ml d'agarose 2% et de 4 μ l de bromure d'éthidium nécessaire à la visualisation des bandes d'ADN. Une pointe de marqueur de poids moléculaire ou 10 μ l de chaque échantillon sont placés dans les puits du gel d'électrophorèse. Pour la migration, un courant de 100 V est appliqué. L'observation du gel se fait sous UV.

3. Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs)

3.1. Extraction de MEFs à partir d'embryons (Tableau II-4)

La souris mère est tuée par dislocation cervicale entre le 12^{ème} et 14^{ème} jour de gestation. Une fois la souris ouverte, l'utérus est détaché des différents vaisseaux l'irriguant et mis à 4°C (sur

Tableau II-4 : Extraction de MEFs – Matériel

PBS stérile (<i>Lonza</i> , BE)	
Trypsine EDTA (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK)	
Milieu de culture complet	Dulbelcco's modified Eagle's medium (DMEM) avec 1 g/l de glucose, 580 mg/l de glutamine et 110 mg/l de pyruvate (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) Acides aminés non essentiels (MEM NEAA (100x)) (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) Antibiotiques (PenStrep) (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) 10% de sérum de veau fœtal (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK)
Tamis cellulaire (<i>BD Falcon</i> , USA)	
Plaque 24-puits (<i>Corning</i> , USA)	
Boîte de culture de 75 cm ² (T75) ou 25 cm ² (T25) (<i>Corning</i> , USA)	
Tubes de 15 ml ou de 50 ml (<i>Corning</i> , USA)	

Tableau II-5 : Tampon de lyse pour le géotypage des MEFs

Tampon de lyse	100 mM de Tris pH 8 (<i>Sigma</i> , USA) 1 mM d'EDTA (<i>Sigma</i> , USA) 100 mM de NaCl (<i>VWR</i> , USA) 1% de SDS (<i>Sigma</i> , USA)
----------------	---

Tableau II-6 : Lignées cancéreuses – Milieu de culture

HepG2	Dulbelcco's modified Eagle's medium (DMEM) avec 1 g/l de glucose, 580 mg/l de glutamine et 110 mg/l de pyruvate (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) 10% de sérum de veau fœtal (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK)
MDA-MB-231	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium 1640 (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) 10% de sérum de veau fœtal (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK)
HCT116	McCoy's 5A (modified) medium (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) 10% de sérum de veau fœtal (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK)

Tableau II-7 : Incubation des cellules avec un agent chimiothérapeutique

Serum-free CO ₂ -independent medium (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK)	
L-glutamine (<i>Sigma</i> , USA)	
Etoposide (<i>Sigma</i> , USA)	
Doxorubicine (<i>Sigma</i> , USA)	

glace) dans une boîte de Pétri contenant du PBS. Pour les étapes suivantes concernant les embryons, il est nécessaire de travailler stérilement. Chaque embryon est sorti de l'utérus et séparé des structures annexes (sac vitellin, placenta) et mis à 4°C dans un puits d'une plaque 24-puits contenant 1 ml de PBS. Trois parties différentes peuvent être considérées au niveau des embryons. La foie (partie rouge) est enlevé et jeté. La tête (partie possédant deux points noirs, les yeux) est retirée et gardée afin de réaliser le génotypage des embryons. La troisième partie contient principalement les MEFs et est donc gardée dans le puits. Il est possible que d'autres types cellulaires soient présents mais une fois mis en culture, seuls les MEFs proliféreront. Le PBS est vidé des puits et 1 ml de trypsine EDTA est ajouté dans les différents puits. Après avoir été dégrossi aux ciseaux, le tissu contenant les MEFs est incubé pendant 30 minutes à 37°C, avec une étape d'homogénéisation durant ces 30 minutes. Ensuite, le mix trypsine-tissu est repris dans un tube de 15 ml et 5 ml de milieu complet sont ajoutés. Après avoir été homogénéisé, le tout est passé sur un tamis cellulaire. La solution récoltée contient les MEFs. Celle-ci est alors mise dans une boîte de culture dont la taille (25 cm² (T25) ou 75 cm² (T75)) dépend de la taille de l'embryon, et incubée à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ jusqu'à confluence. Si la boîte de culture choisie est une T75, la solution contenant les MEFs doit être complétée avec 10 ml de milieu de culture complet.

3.2. Génotypage

Le protocole est identique au génotypage des souris excepté la composition du tampon de lyse (Tableau II-5). De plus, le génotypage se réalise dans ce cas à partir de la tête de l'embryon.

4. Lignées cancéreuses

Différentes lignées de cellules cancéreuses ont été utilisées. Les cellules sont maintenues dans des boîtes de culture de 75 cm² avec 15 ml de milieu de culture spécifique de chacune des lignées (Tableau II-6) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

5. Incubation des cellules en hypoxie et/ou en présence d'un agent chimiothérapeutique (Tableau II-7)

L'incubation des cellules en hypoxie se fait à 37°C dans une atmosphère contenant 1% d'O₂ et dans un milieu CO₂-indépendant sans sérum supplémenté avec 0,5 mM de glutamine. Pour les cellules contrôles en normoxie, les cellules sont incubées dans le même milieu à 37°C mais dans une atmosphère contenant 20% d'O₂.

L'incubation des cellules avec un agent anticancéreux se fait dans du milieu CO₂-indépendant sans sérum supplémenté avec 72 mg/l de glutamine, et additionné d'étoposide (de 1 µM à 100 µM) ou de doxorubicine (de 1 µM à 50 µM). Les cellules contrôles sont incubées en présence du même milieu mais sans agent anticancéreux. Pour chaque concentration d'agent anticancéreux ainsi que pour les contrôles, des triplicats sont réalisés.

6. Test de viabilité cellulaire au MTT (Tableau II-8)

Le MTT est incorporé par les cellules métaboliquement actives et réduit par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase, en son dérivé formazan. Ce dernier forme des cristaux violets insolubles en milieu aqueux. Plus il y a des cellules vivantes dans les puits, plus

Tableau II-8 : Test MTT – Matériel

Réactif MTT	2,5 mg/ml de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium) (<i>Sigma</i> , USA) dilué dans du PBS
PBS	2% de tampon phosphate (KH_2PO_4 (<i>Merck</i> , GE)/ K_2HPO_4 (<i>Merck</i> , GE)) 0,5 M pH 7,4 150 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE)
Tampon de lyse	1/3 de N,N-diméthylformamide (<i>Sigma</i> , USA) 2/3 de SDS (<i>MP Biomedicals</i> , USA) 30% pH 4,7
Spectrophotomètre	(xMark microplate spectrophotometer (<i>BioRad</i> , USA))

Tableau II-9 : Nombre de cellules repiquées pour les différents tests

	MTT/LDH (en 24-puits)	MTT prolifération (en 24-puits)	Caspase-3 (en T25)
MEFs	25000	18000	350000 ou 400000
HepG2	50000	/	1000000
MDA-MB-231	50000	/	1000000
HCT116	75000	/	/

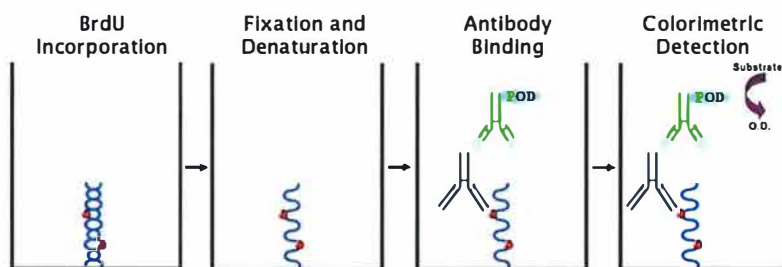


Figure II-2 : Schéma représentant le principe du test d'incorporation du BrdU. Le BrdU se trouvant dans le milieu de culture des cellules est incorporé dans l'ADN lors de sa synthèse. Les cellules sont fixées et l'ADN dénaturé ce qui permet la fixation de l'anticorps anti-BrdU au niveau du BrdU sur les brins d'ADN. Cet anticorps est couplé à une peroxydase (POD) qui permet la génération d'un produit coloré en présence de son substrat (adapté de <http://www.cellbiolabs.com/brdu-cell-proliferation-elisa-kit>).

Tableau II-10 : Test d'incorporation de BrdU – Matériel

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) (<i>Roche</i> , CH)	
- « BrdU labeling reagent » dilué 100x dans le milieu de culture complet = solution BrdU - FixDenat - « Anti-BrdU-POD stock solution » dilué 100x avec « antibody dilution solution » = anticorps anti-BrdU - « Washing buffer » dilué 10x dans de l'eau distillée = solution de rinçage - Substrate solution	
Milieu de culture complet	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) avec 1g/l de glucose, 580 mg/l de glutamine et 110 mg/l de pyruvate (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) Acides aminés non essentiels (MEM NEAA (100x)) (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) Antibiotiques (PenStrep) (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK) 10% de sérum de veau fœtal (<i>Gibco Life Technologies</i> , UK)
H_2SO_4 (<i>Merck</i> , GE) 1 M	
Spectrophotomètre (xMark microplate spectrophotometer (<i>BioRad</i> , USA))	

il y a de cristaux formés et donc plus l'absorbance mesurée à 570 nm après dissolution des cristaux sera importante.

Les cellules sont repiquées dans une plaque 24-puits à raison d'un nombre précis de cellules par puits, différent pour chaque type cellulaire (Tableau II-9). Après le temps d'incubation avec l'agent anticancéreux, les cellules sont incubées en présence de 500 μ l du réactif MTT pendant 2h à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Après quoi, le milieu des cellules est enlevé et 1 ml de tampon de lyse ajouté. Après 1h à 37°C avec agitation, la solution est homogénéisée et la plaque est lue à 570 nm.

Le test MTT a également été utilisé pour évaluer la prolifération des MEFs. Après 24h, 48h, 72h ou 96h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, le même protocole que ci-dessus a été utilisé.

7. Test d'incorporation du BrdU (Tableau II-10)

Le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) est un analogue pyrimidique. Lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture des cellules, il est incorporé à la place des bases pyrimidiques dans l'ADN synthétisé pour la division cellulaire. L'incorporation de BrdU est donc en indicateur de la prolifération cellulaire. Le principe de ce test (Figure II-2) est d'ajouter du BrdU dans le milieu de culture des cellules. Après un temps d'incubation, les cellules sont fixées et l'ADN dénaturé. Cela permet à l'anticorps reconnaissant le BrdU d'entrer dans les cellules et de se fixer au BrdU au niveau de l'ADN. Cet anticorps est couplé à une peroxydase ce qui fait qu'en ajoutant un substrat de celle-ci, un produit coloré apparaît. Les valeurs d'absorbance obtenues après lecture sont directement proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé et donc avec le nombre de cellules prolifératives dans les différentes conditions.

Les MEFs sont repiqués dans une plaque 96-puits à raison de 2000 ou 2500 cellules par puits dans un volume final de 100 μ l par puits. La prolifération est évaluée à trois temps après le repiquage et donc trois plaques sont nécessaires. 24h, 48h et 72h après le repiquage, 10 μ l de solution BrdU sont ajoutés dans les puits. Après 24h d'incubation avec le BrdU, le milieu est jeté et 200 μ l de FixDenat sont ajoutés pendant 30 minutes à température ambiante afin de fixer les cellules et de dénaturer l'ADN. Après avoir jeté le FixDenat, 100 μ l d'anticorps anti-BrdU sont ajoutés. L'incubation se fait à température ambiante pendant 90 minutes. Les puits sont alors rincés trois fois avec la solution de rinçage et puis la solution substrat (100 μ l) est mise dans les puits. L'absorbance peut être lue sans stopper la réaction, à 370 nm. Pour stopper la réaction, 25 μ l d'H₂SO₄ 1 M sont ajoutés et l'absorbance est alors lue à 450 nm.

8. Test de cytotoxicité par mesure du relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) (Tableau II-11)

Lorsque les cellules meurent, elles libèrent leurs constituants cytosoliques dans le milieu de culture. C'est le cas notamment d'une enzyme, la lactate déshydrogénase (LDH). Donc, au plus la mort cellulaire est importante, au plus l'activité LDH dans le milieu est importante. Cette enzyme catalyse la réduction du NAD⁺ en NADH + H⁺ par l'oxydation du lactate en pyruvate. Dans le dosage utilisé ici, ce NADH + H⁺ est ensuite utilisé par une diaphorase pour réduire un sel de tétrazolium en son dérivé formazan rouge (Figure II-3). Le kit utilisé est constitué de deux solutions : l'une contenant la diaphorase et l'autre contenant les réactifs.

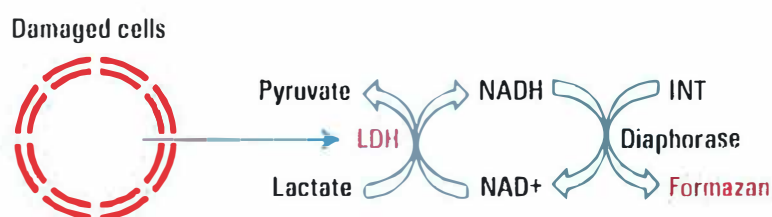


Figure II-3 : Schéma représentant la réaction exploitée pour le test LDH. Les cellules endommagées libèrent la LDH. Celle-ci peut être révélée par la catalyse de l'oxydation du lactate en pyruvate, qui s'accompagne de la réduction du NAD⁺ en NADH. Ce dernier est ensuite utilisé dans une autre réaction, catalysée par une diaphorase et qui forme un composé rouge (<http://www.piercenet.com/product/ldh-cytotoxicity-assay-kit>).

Tableau II-11 : Mesure du relargage de LDH – Matériel

PBS-Triton-X100	2,5 g de Triton-X100 (<i>Sigma</i> , USA) 25 ml de PBS
PBS	2% de tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ (<i>Merck</i> , GE)/K ₂ HPO ₄ (<i>Merck</i> , GE)) 0,5 M pH 7,4 150 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (<i>Roche</i> , CH) - Bouteille 1 capuchon bleu = solution « catalyseur » - Bouteille 2 capuchon rouge = solution de coloration	
Centrifugeuse (Centrifuge 5415 R (<i>Eppendorf</i> , GE))	
Spectrophotomètre (xMark microplate spectrophotometer (<i>BioRad</i> , USA))	

Tableau II-12 : Mesure de l'activité caspase-3 – Matériel

PBS	2% de tampon phosphate (KH ₂ PO ₄ (<i>Merck</i> , GE)/K ₂ HPO ₄ (<i>Merck</i> , GE)) 0,5 M pH 7,4 150 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE)
Tampon de lyse	2 ml de tampon de lyse 2x 0,4 g de sucrose 20 µl de DTT (<i>Sigma</i> , USA) 1 M 28 µl d'aprotinine (<i>Sigma</i> , USA) 1,952 ml d'H ₂ O milliQ
Tampon de lyse 2x	20 mM d'Hepes (<i>Sigma</i> , USA) 4 mM d'EDTA (<i>Merck</i> , GE) 0,2% de CHAPS (<i>Life Science</i> , USA) pH 7
Tampon de réaction	1,5 ml de tampon de réaction 2x 0,15 g de sucrose 15 µl de DTT (<i>Sigma</i> , USA) 1M
Tampon de réaction 2x	40 mM de PIPES (<i>Sigma</i> , USA) 200 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE) 2 mM d'EDTA (<i>Merck</i> , GE) 0,2% de CHAPS (<i>Life Science</i> , USA) pH 7,2
Ac-DEVB-AFC (<i>BD Pharmingen</i> , USA)	
Cell-scraper (<i>Techno Plastic Products</i> , CH)	
Centrifugeuses	Centrifuge 5810 R (<i>Eppendorf</i> , GE) 1-15PK Refrigerated Microcentrifuge (<i>Sigma Laborzentrifugen</i> , GE)
Spectrophotomètre (LS-45 fluorescence spectrometer (<i>Perkin Elmer</i> , USA))	

Les cellules sont repiquées dans une plaque 24-puits à raison d'un nombre précis de cellules par puits, différent pour chaque type cellulaire (Tableau II-9). Après le temps d'incubation avec l'agent anticancéreux, le milieu est repris dans un eppendorf annoté « culot ». Celui-ci est centrifugé 5 min à 2000 rpm. Le surnageant est alors repris et placé dans un eppendorf annoté « surnageant ». Le culot n'étant pas visible, un peu de surnageant est laissé en essayant de garder la même chose pour tous les échantillons afin de limiter le biais. Le culot est alors resuspendu dans 250 µl de PBS-Triton-X100. 250 µl de PBS-Triton-X100 sont ajoutés sur les cellules dans les puits. Après au moins 10 min sur agitation, la solution est récupérée dans un eppendorf annoté « lysat ».

100 µl du « culot » représentant l'activité LDH des cellules détachées et des corps apoptotiques et 100 µl du « surnageant » représentant l'activité LDH dans le milieu sont mis dans les puits d'une plaque 96-puits. Le « lysat » représentant l'activité LDH des cellules restant dans les puits est dilué 20x dans du PBS-Triton-X100 (5 µl de lysat dans 95 µl de PBS-Triton-X100). Le blanc pour les échantillons « culot » et « lysat » correspond à 100 µl de PBS-Triton-X100, et celui pour les échantillons « surnageant » à 100 µl de milieu seul.

Le mix de réaction est ensuite préparé. Pour 100 puits, 222 µl de la solution « catalyseur » sont mélangés à 10 ml de la solution de coloration. 100 µl de ce mix sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est conservée à température ambiante à l'abri de la lumière. Si des bulles sont présentes dans les puits, il est nécessaire de les enlever. L'absorbance est lue à 490 nm et 655 nm toutes les 15 min jusqu'à ce que la plus haute valeur soit entre 2 et 3.

La cytotoxicité est ensuite calculée grâce à la formule qui suit : $[(4 \times \text{l'activité LDH dans le milieu (1)}) + (\text{l'activité LDH des cellules détachées et des corps apoptotiques (2)})] / [(1) + (2) + (20 \times \text{l'activité LDH des cellules restant dans les puits})]$. Les valeurs des différentes activités LDH correspondent aux valeurs mesurées auxquelles a été soustrait leur blanc respectif.

9. Mesure de l'activité caspase-3 (Tableau II-12)

L'activité caspase-3 est mesurée grâce au substrat Ac-DEVD-AFC qui, en étant clivé par la forme active de la caspase-3, libère une molécule fluorescente.

Les cellules sont repiquées dans des T25 à raison d'un nombre précis de cellules par T25 pour chaque type cellulaire (Tableau II-9). Après le temps d'incubation avec l'agent chimiothérapeutique, le milieu est collecté dans un tube de 15 ml. Après une centrifugation de 5 min à 1200 rpm à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 100 µl de PBS. Les cellules sont récoltées de la T25 dans 200 µl de PBS (en raclant). Cette étape se réalise deux fois afin de récolter le plus de cellules possibles. Le culot resuspendu et les cellules récoltées sont placés ensemble dans un eppendorf et centrifugé 5 min à 1200 rpm à 4°C. Le surnageant est alors éliminé et le culot resuspendu dans 50 µl de tampon de lyse. Après 15 min sur roue à 4°C et une centrifugation de 5 min à 13000 rpm à 4°C, le surnageant est récolté (stockage à -80°C).

Afin de normaliser l'activité caspase-3 mesurée, il est nécessaire que la même quantité de protéines soient utilisées. Pour cela, la concentration protéique des échantillons est mesurée grâce au réactif de Pierce (pour le protocole, voir point 12). Entre 5 et 20 µg de protéines (la même quantité pour tous les échantillons d'une même expérience) complétés jusqu'à 100 µl de tampon de lyse (pour le blanc, 100 µl de tampon de lyse) sont mélangés avec 50 µl de tampon de réaction et 1 µl d'Ac-DEVD-AFC. Après 1h d'incubation dans l'obscurité à 37°C, la

Tableau II-13 : Marquage en immunofluorescence – Matériel

PBS	2% de tampon phosphate (KH_2PO_4 (Merck, GE)/ K_2HPO_4 (Merck, GE)) 0,5 M pH 7,4 150 mM de NaCl (Merck, GE)
PBS- BSA 2%	2 g de BSA (Santa Cruz Biotechnology, USA) 100 ml de PBS
PBS-Triton 1%	0,25 g de Triton-X100 (Sigma, USA) 25 ml de PBS
PFA 4% (dilué dans du PBS) (Merck, GE)	
Hoechst 33258 (Molecular Probes, USA)	
Mowiol (Sigma, USA)	
Microscope confocal à fluorescence (Leica, GE)	

Tableau II-14 : Anticorps primaires utilisés pour le marquage en immunofluorescence

TMEM45A	Dilution 250x	Ac monoclonal de lapin	(A78436, Sigma, USA)
GM130	Dilution 500x	Ac monoclonal de souris	(610823, BDTransduction Laboratories, USA)

Tableau II-15 : Anticorps secondaires utilisés pour le marquage en immunofluorescence

Goat anti-rabbit IgG Alexa 488 nm	Dilution 1000x	(A-11008, Molecular Probes, USA)
Goat anti-mouse IgG Alexa 568 nm	Dilution 1000x	(A-11004, Molecular Probes, USA)

fluorescence générée par la libération du groupement fluorescent AFC est mesurée à 400 nm pour l'excitation et 505 nm pour l'émission.

10. Marquage en immunofluorescence (Tableau II-13)

Un marquage en immunofluorescence permet la détection de l'expression d'une protéine ainsi que sa localisation au niveau cellulaire par sa reconnaissance par un anticorps. La méthode choisie est celle de l'immunofluorescence indirecte. Pour celle-ci, deux anticorps sont utilisés. L'anticorps primaire reconnaît la protéine d'intérêt et est spécifique d'une espèce. L'anticorps secondaire reconnaît lui l'anticorps primaire en reconnaissant l'espèce de celui-ci. De plus, l'anticorps secondaire est porteur d'un fluorochrome.

Les MEFs sont repiqués dans une plaque 24-puits à raison de 25.000 cellules/puits, sur un couvre-objet stérile placé au fond de chaque puits. Les étapes suivantes commencent soit 24h après le repiquage, soit après l'incubation en normoxie ou en hypoxie des cellules.

Le milieu est vidé délicatement et les cellules sont rincées trois fois avec du PBS (500 µl). Elles sont ensuite fixées pendant 10 minutes à température ambiante avec de la paraformaldéhyde 4% (500 µl) préalablement chauffée à 37°C. Après quoi, les cellules sont à nouveau rincées trois fois avec du PBS (500 µl). Elles peuvent alors être stockées à 4°C. Afin de permettre l'entrée des anticorps, les cellules sont perméabilisées avec du PBS-Triton 1% pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite rincées trois fois 10 minutes avec du PBS-BSA à température ambiante.

L'anticorps primaire (ou le mélange d'anticorps primaires si un co-marquage est réalisé ; Tableau II-14) est préparé à la dilution adéquate dans du PBS-BSA et 30 µl sont déposés sur un parafilm placé dans une chambre humide. Les couvre-objets sont déposés sur cette goutte en veillant à mettre le côté avec les cellules contre celle-ci. Pour le contrôle négatif de l'anticorps primaire, la goutte d'anticorps est remplacée par une goutte de PBS-BSA. L'incubation avec l'anticorps primaire se fait à température ambiante, en chambre humide, pendant 2h. Après quoi, les couvre-objets sont remis dans les puits d'une plaque 24-puits en veillant à ce que les cellules se trouvent vers l'extérieur et ils sont rincés trois fois 5 minutes à température ambiante avec du PBS-BSA.

L'anticorps secondaire (ou le mélange d'anticorps secondaires si un co-marquage est réalisé ; Tableau II-15) est également préparé à la dilution adéquate. Le procédé pour l'incubation avec l'anticorps secondaire est identique à celui de l'anticorps primaire, excepté que le temps d'incubation est de 1h et se fait à l'abri de la lumière. Après quoi, les couvre-objets sont remis dans les puits d'une plaque 24-puits en veillant à ce que les cellules se trouvent vers l'extérieur et ils sont rincés trois fois 5 minutes à température ambiante avec du PBS-BSA et une fois 5 minutes avec du PBS.

L'Hoechst est utilisé pour marquer les noyaux des cellules. Celui-ci est préparé à la dilution adéquate et 30 µl sont déposés sur un parafilm placé dans une chambre humide. Le procédé pour l'incubation avec l'Hoechst est identique à celui de l'anticorps primaire et secondaire. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante en chambre humide à l'abri de la lumière, les couvre-objets sont remis dans les puits d'une plaque 24-puits en veillant à ce que les cellules se trouvent vers l'extérieur et ils sont rincés trois fois 5 minutes avec du PBS.

Les couvre-objets sont ensuite montés sur lame avec une goutte de Mowiol préalablement chauffée à 56°C. Ils peuvent alors être observés au microscope confocal Sp5.

Tableau II-16 : Extraction d'ARN – Matériel

RNeasy Mini Kit (<i>Qiagen</i> , DE)	Buffer RLT Buffer RW1 Buffer RPE Mini spin column
Ethanol (<i>Merck</i> , GE) 70%	
DNase + Buffer RDD (<i>Qiagen</i> , DE)	
QIAcube (<i>Qiagen</i> , DE)	
Microtube 1,5 ml et 2 ml QIAcube (<i>Qiagen</i> , DE)	
Cell-scraper (<i>Techno Plastic Products</i> , CH)	

Tableau II-17 : Volume de tampon RLT

Nombre de cellules	Volume de tampon RLT (µl)
$< 5 \times 10^6$	350
$5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$	600

Tableau II-18 : Rétro-transcription – Matériel

Nanodrop Spectrophotometer ND1000 (<i>Isogen Lifescience</i> , DE)	
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (<i>Roche</i> , CH)	
Mix réactionnel (pour 1 échantillon)	4 µl de Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer 0,5 µl de Protector RNase Inhibitor 2 µl de Deoxynucleotide Mix 0,5 µl de Transcriptor Reverse Transcriptase

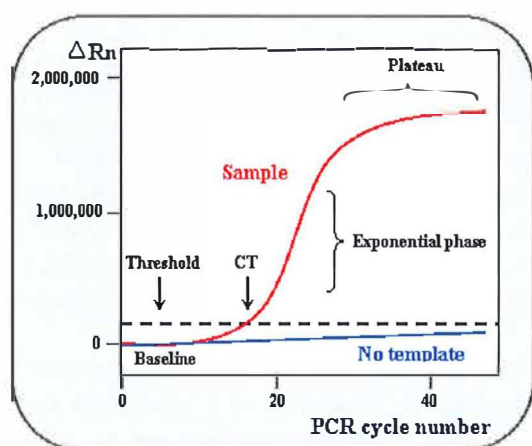


Figure II-4 : Modèle de graphique obtenu à la fin de la PCR en temps réel. À chaque cycle, la fluorescence émise (ΔR_n) par la liaison de la sonde fluorescente aux doubles brins d'ADN généré est mesurée. Au début, la courbe suit une ligne de base (baseline) où aucune fluorescence n'est détectée car trop peu d'ADN double brin est présent. Un seuil (threshold) est déterminé et lorsque celui-ci coupe la courbe d'amplification, il renvoie à un nombre de cycles PCR (Ct sur le schéma, correspondant au Cq).

Tableau II-19 : PCR en temps réel – Matériel

Mix réactionnel (pour 1 échantillon)	2,5 µl d'H ₂ O milliQ 2,5 µl de l'amorce sens 2,5 µl de l'amorce anti-sens 12,5 µl de Power SYBRGreen PCR Master Mix (<i>Roche</i> , CH)
StepOnePlus Real-Time PCR System (<i>Applied Biosystems</i> , USA)	

Tableau II-20 : Séquence des amorces

TMEM45A (27 µM)	S	TTGCTGGCATTATGCATCAATC
	AS	CAGCCCTTCCTCAGCCTAGAC
PPIE (27 µM)	S	AGAGGTGGACGACAAGGTTC
	AS	TCCTCTGCCAACTCAAACCTCA
TBP (27 µM)	S	CAGTTACAGGTGGCAGCATGA
	AS	TAGTGCTGCAGGGTGATTTTCAG

11. RT-qPCR

11.1. Extraction de l'ARN total (Tableau II-16)

L'extraction d'ARN à partir de MEFs est réalisée grâce au kit mini de QIAGEN et au QIAcube. Le milieu des MEFs est jeté et un volume adéquat de tampon RLT (le volume étant fonction du nombre de cellules (Tableau II-17)) ajouté. Les cellules sont raclées et la solution est reprise dans un tube de 2 ml adapté au QIAcube. Les étapes suivantes sont réalisées par le QIAcube qui doit être préparé. Les tubes de 2 ml sont placés à l'endroit indiqué. Les rotors adaptateurs contenant chacun une colonne et un tube de 1,5 ml pour la récolte de l'éluat sont placés dans la centrifugeuse du QIAcube au bon endroit par rapport au tube de 2 ml leur correspondant. Des tips adaptés sont également placés dans le QIAcube ainsi que les différents agents du kit mini QIAGEN. Enfin, le mélange de DNase est préparé pour le nombre adéquat d'échantillons et placé au bon endroit dans le QIAcube. Le bon programme est choisi (kit mini / DNase / large ou standard (dépend du volume de tampon RLT)) et le run lancé. À la fin, les tubes de 1,5 ml sont gardés et stockés à -80°C jusqu'à la rétro-transcription.

11.2. Rétro-transcription (Tableau II-18)

Pour cette étape de rétro-transcription, le kit fourni par Roche est utilisé avec tous les réactifs nécessaires. La concentration en ARN est évaluée par le NanoDrop. 2 μg d'ARN sont complétés avec de l'eau RNase-free jusqu'à 12 μl et auxquels est ajouté 1 μl d'oligo dT. Ces amorces permettent de sélectionner uniquement les ARN messagers (ARN_m) et donc seulement ceux-ci seront rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADN_c). En effet, les oligo dT reconnaissent la queue polyA qui est une caractéristique des ARN_m. Ce mélange est chauffé pendant 10 minutes à 65°C . Ensuite, 7 μl du mix réactionnel sont ajoutés à l'échantillon qui est mis à 55°C pendant 30 minutes. Après quoi l'échantillon est chauffé pendant 5 minutes à 85°C . Après chaque incubation à température, les échantillons sont spinnés et gardés sur glace.

11.3. PCR en temps réel (Tableau II-19)

La PCR en temps réel permet une quantification de l'ADN_c ce qui permet une comparaison de l'expression d'un même gène dans différentes conditions. Elle se base sur la liaison de sondes fluorescentes à l'ADN double brin. L'intérêt est porté sur le niveau d'expression des gènes. Un seuil de fluorescence est établi et celui-ci renvoie à une valeur de C_q (quantification cycle) qui est la base pour les calculs de quantification. Une courbe sigmoïde est obtenue avec un plateau à la fin car l'amplification n'est pas infinie (limitation par la quantité de dNTP,...) et une zone exponentielle au début (Figure II-4). L'amplification d'un gène de référence (house keeping gene) est également étudiée dans le but d'avoir un contrôle interne à la manipulation qui servira pour normaliser les valeurs lors des calculs. En effet, un tel gène est exprimé de façon constante dans les cellules.

Le mix réactionnel pour chaque gène étudié est préparé pour le nombre d'échantillons avec de l'eau, les amorces sens et anti-sens (Tableau II-20) à leur concentration optimale (300 nM), et du SYBR Green. 20 μl de ce mix sont mis dans les puits de la plaque auxquels sont ajoutés 5 μl d'ADN_c dilué 100x ou d'eau pour les blancs. Pour chaque gène étudié, les échantillons sont mesurés en double. Une fois prête, la plaque est scellée et centrifugée 30 secondes à 600 rpm. La plaque est ensuite mise dans la machine et le run est lancé.

Tableau II-21 : Extraction protéique à partir d'organes – Matériel

Tampon de lyse	20 mM de MES (<i>Sigma</i> , USA) 30 mM de Tris (<i>Merck</i> , GE) 100 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE) 1% de Triton-X100 (<i>Sigma</i> , USA) 20 mM de NEM (<i>Sigma</i> , USA) 1/25 de PIC 1/25 de PIB
PIB	25 mM de Na ₃ VO ₄ (<i>Sigma</i> , USA) 250 mM de PNPP (<i>Sigma</i> , USA) 250 mM de β-glycérophosphate (<i>VWR</i> , USA) 125 mM de NaF (<i>Merck</i> , GE)
PIC	1 tablette du kit COMPLETE (<i>Roche</i> , CH) 2 ml d'H ₂ O milliQ
Ultra-turrax (<i>IKA Van der Heyden</i> , GE)	
Centrifugeuse (2K15 Bioblock scientific (<i>Sigma Laborzentrifugen</i> , GE))	

Tableau II-22 : Extraction protéique à partir de MEFs – Matériel

Tampon de lyse	20 mM de MES (<i>Sigma</i> , USA) 30 mM de Tris (<i>Merck</i> , GE) 100 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE) 1% de Triton-X100 (<i>Sigma</i> , USA) 20 mM de NEM (<i>Sigma</i> , USA) 1/25 de PIC 1/25 de PIB
PIB	25 mM de Na ₃ VO ₄ (<i>Sigma</i> , USA) 250 mM de PNPP (<i>Sigma</i> , USA) 250 mM de β-glycerophosphate (<i>VWR</i> , USA) 125 mM de NaF (<i>Merck</i> , GE)
PIC	1 tablette du kit COMPLETE (<i>Roche</i> , CH) 2 ml d'H ₂ O milliQ
Cell-scraper (<i>Techno Plastic Products</i> , CH)	
Centrifugeuses	Centrifuge 5810 R (<i>Eppendorf</i> , GE) 1-15PK Refrigerated Microcentrifuge (<i>Sigma Laborzentrifugen</i> , GE)

Tableau II-23 : Dosage de Pierce – Matériel

BSA (Albumin Standard (2 mg/ml)) (<i>Thermo Scientific</i> , USA)
Réactif de Pierce (<i>Thermo Scientific</i> , USA)
Spectrophotomètre (xMark microplate spectrophotometer (<i>BioRad</i> , USA))

Tableau II-24 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de Pierce

BSA	0 µg	1 µg	2,5 µg	5 µg	7,5 µg	10 µg
Volume de BSA	0 µl	1 µl	2,5 µl	5 µl	7,5 µl	10 µl
Volume d'eau	10 µl	9 µl	7,5 µl	5 µl	2,5 µl	0 µl

À la fin du run, les valeurs de Cq sont obtenues ce qui permet d'étudier l'expression relative en ARN_m . Pour cela, différents calculs sont effectués :

- $\Delta Cq = Cq - Cq \text{ gène de référence} \rightarrow \text{normalisation}$
- $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq - \Delta Cq \text{ condition contrôle choisie}$
- Niveau d'expression = $2^{-\Delta\Delta Cq}$

12. Western Blot

12.1. Extraction protéique

À partir d'organes (Tableau II-21)

Une fois la souris tuée par dislocation cervicale, celle-ci est ouverte et les organes d'intérêt sont prélevés. Les différents organes sont pesés et un volume de tampon de lyse 10 fois supérieur est ajouté. Après avoir été découpés en petits morceaux, les organes sont broyés à l'ultraturax. Après 15 min d'incubation sur glace, les échantillons sont centrifugés 10 min à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant est récolté dans un nouvel eppendorf. Les échantillons peuvent alors être stockés à -80°C.

À partir de MEFs (Tableau II-22)

Les cellules sont repiquées à raison de 1200000 cellules par T75 et incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ jusqu'au lendemain. Le milieu des cellules est collecté et centrifugé 5 min à 1200 rpm à 4°C. Après quoi, le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans 100 µl de PBS. Les cellules sont raclées dans 300 µl de PBS et la T75 est ensuite rincée avec ce même volume de PBS. Le culot resuspendu et les cellules récoltées sont placés ensemble dans un eppendorf et centrifugés 5 min à 1200 rpm à 4°C. Après l'élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 50 µl de tampon de lyse. Après 15 min sur roue à 4°C et une centrifugation de 5 min à 13000 rpm à 4°C, le surnageant est récolté (stockage à -80°C).

12.2. Dosage par le réactif de Pierce (Tableau II-23)

Lors de l'électrophorèse, il est nécessaire de charger la même quantité de protéines pour les différents échantillons. La concentration en protéines des échantillons doit donc être évaluée. Pour cela, le réactif de Pierce est utilisé. Lors de la liaison du colorant métallique que contient ce réactif aux protéines, un changement de l'absorbance maximum du colorant a lieu qui est mesuré à 660 nm. Le dosage se réalise en plaque 96-puits et les mesures d'absorbance à 660 nm en duplicat.

Afin de réaliser une droite d'étalonnage nécessaire pour déterminer la concentration des différents échantillons, une solution de protéine de concentration connue est utilisée (BSA 1 µg/µl). Différentes concentrations de BSA sont réalisées (Tableau II-24) et leur absorbance est mesurée. Le 0 µg/µl de BSA correspond au blanc pour la droite d'étalonnage. 2 µl des échantillons sont mis dans 8 µl d'eau. Le blanc pour ceux-ci correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance de 2 µl de tampon de lyse dans 8 µl d'eau. A ces 10 µl par puits sont ajoutés 150 µl du réactif de Pierce. La plaque est maintenue à l'abri de la lumière pendant 5 min (la réaction est alors stabilisée) et ensuite lue à l'aide d'un spectrophotomètre à 660 nm. La droite d'étalonnage est réalisée via excel et de l'équation qui en découle ($y = ax + b$), la concentration des différents échantillons est déterminée, sachant que le « y » correspond à l'absorbance et le x à la concentration. Comme 2 µl ont été chargés pour le dosage des

Tableau II-25 : Electrophorèse, transfert, blocage, révélation – Matériel

Bleu de charge 5x	10 ml de tampon Tris (0,5 M ; (<i>Merck</i> , GE)) / SDS (0,4% ; (<i>MP Biomedicals</i> , USA)) pH 6,8 10 ml de SDS (<i>MP Biomedicals</i> , USA) 20% 5 ml de β -mercaptoéthanol (<i>Fluka Biochemica</i> , <i>Sigma</i> , USA) 10 ml de glycérol 85% (<i>Merck</i> , GE) 17,5 mg de bleu de bromophénol (<i>Merck</i> , GE)
PBS	2% de tampon phosphate (KH_2PO_4 (<i>Merck</i> , GE)/ K_2HPO_4 (<i>Merck</i> , GE)) 0,5 M pH 7,4 150 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE)
Tampon d'électrophorèse	25 mM de Tris (<i>Merck</i> , GE) 0,192 M de glycine (<i>Merck</i> , GE) 0,1% de SDS (<i>MP Biomedicals</i> , USA) pH 8,3-8,5
Gel d'électrophorèse (Mini-PROTEAN TGX Gel 10%, 10 well-comb, 30 μ l #456-1033 (<i>BioRad</i> , USA))	
Tampon de transfert	40 mM de Tris (<i>Merck</i> , GE) 0,3 M de glycine (<i>Merck</i> , GE) 20% de méthanol (<i>Acros Organic</i> , USA)
Transfer Membranes PVDF (<i>Immobilon</i> , USA)	
Solution de blocage	50% de Odyssey Blocking Buffer (= LICOR) (<i>Li-Cor</i> , USA) 50% de PBS
Tween 20 (<i>BioRad</i> , USA)	
Scanner Odyssey Image System (<i>Li-Cor</i> , USA)	

échantillons, il est nécessaire de diviser par 2 la valeur obtenue pour avoir la concentration en protéines par μl .

12.3. Préparation des échantillons (Tableau II-25)

Jusqu'à 30 μg de protéines sont pris dans un volume maximum de 24 μl (la même quantité de protéines pour chaque échantillon). Le volume d'eau nécessaire pour atteindre 24 μl est ajouté ainsi qu'1/5 de bleu de charge 5x (6 μl). Le volume final est donc de 30 μl . Après avoir été vortexés, les échantillons sont chauffés à 37°C pendant 3 min et ensuite centrifugé 2 min à 13000 rpm.

12.4. Électrophorèse (Tableau II-25)

L'électrophorèse permet de séparer les protéines présentes dans les échantillons en fonction de leur poids moléculaire.

Pour chaque échantillon, les 30 μl préparés comme ci-dessus sont déposés dans un puits du gel d'électrophorèse. Pour le marqueur de poids moléculaire, seulement 5 μl sont chargés sur le gel. La migration a lieu dans le tampon d'électrophorèse et se fait à 150 V, 400 mA et 15 W/gel. La migration est arrêtée quand le front de migration se trouve en bas du gel.

12.5. Transfert (Tableau II-25)

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidene fluoride). Cela permet d'une part de fixer les protéines et d'autre part de concentrer en une zone précise toutes les protéines se trouvant dans l'épaisseur du gel.

La membrane étant hydrophobe, il est nécessaire de préalablement la réhydrater en la passant 1 min dans du méthanol et en la rinçant ensuite dans le tampon de transfert.

Au vu de la charge négative des protéines, le transfert se réalise en les faisant migrer vers la cathode, et ce dans le tampon de transfert. Le montage en sandwich se réalise donc comme suit :

- Borne négative
- Éponge
- Papier Whatman (x 2)
- Gel
- Membrane
- Papier Whatman (x2)
- Éponge
- Borne positive

Le transfert réalisé est un transfert liquide, ce qui permet d'avoir plus de protéines transférées. Pour éviter l'échauffement du système, la cuve utilisée contient un glaçon et est placée dans un bac rempli de glace mouillée sur un agitateur. Le transfert se réalise pendant 1h à 70 V, 400 mA et 100 W.

12.6. Blocage (Tableau II-25)

Après le transfert, les protéines se retrouvent adsorbées à la surface de la membrane. Là où il n'y en a pas, l'anticorps utilisé pour la révélation peut venir se fixer car la membrane a pour

Tableau II-26 : Anticorps primaires utilisés pour le Western-Blot

TMEM45A	Dilution 1000x	Ac monoclonal de lapin	(A78436, <i>Sigma</i> , USA)
β -actine	Dilution 10000x	Ac monoclonal de souris	(<i>Sigma</i> , USA)

Tableau II-27 : Anticorps secondaires utilisés pour le Western-Blot

Goat anti-rabbit 800	Dilution 10000x	(926-32211, <i>Li-Cor</i> , USA)
Goat anti-mouse 700	Dilution 10000x	(926-68070, <i>Li-Cor</i> , USA)

Tableau II-28 : Détection de l'activité β -galactosidase sur des tissus – Matériel

PBS	2% de tampon phosphate (KH_2PO_4 (<i>Merck</i> , GE)/ K_2HPO_4 (<i>Merck</i> , GE)) 0,5 M pH 7,4 150 mM de NaCl (<i>Merck</i> , GE)
Solution de fixation	0,02% de glutaraldéhyde (<i>Sigma</i> , USA) 5 mM d'EGTA (<i>Sigma</i> , USA) 2 mM de MgCl_2 (<i>Merck</i> , GE) Dilués dans du tampon phosphate (KH_2PO_4 (<i>Merck</i> , GE)/ K_2HPO_4 (<i>Merck</i> , GE)) 0,1 M pH 7,3
Solution de rinçage	0,02% de NP-40 (<i>Fluka Biochemica</i> , <i>Sigma</i> , USA) 0,01% de deoxycholate de sodium (<i>Merck</i> , GE) 2 mM de MgCl_2 (<i>Merck</i> , GE) Dilués dans du tampon phosphate (KH_2PO_4 (<i>Merck</i> , GE)/ K_2HPO_4 (<i>Merck</i> , GE)) 0,1 M pH 7,3
Solution de coloration	0,02% de NP-40 (<i>Fluka Biochemica</i> , <i>Sigma</i> , USA) 0,01% de deoxycholate de sodium (<i>Merck</i> , GE) 5 mM de ferricyanure de potassium (<i>Merck</i> , GE) 5 mM de ferrocyanure de potassium (<i>Merck</i> , GE) 2 mM de MgCl_2 (<i>Merck</i> , GE) Dilués dans du tampon phosphate (KH_2PO_4 (<i>Merck</i> , GE)/ K_2HPO_4 (<i>Merck</i> , GE)) 0,1 M pH 7,3 + 1 mg/ml de X-gal (<i>Biosolves BV</i> , DE) dilué dans 1 ml de N,N-diméthylformamide (<i>Sigma</i> , USA)
PFA 4% (dilué dans du PBS) (<i>Merck</i> , GE)	

Tableau II-29 : Inclusion et enrobage en paraffine, microtomie, coloration – Matériel

Préparateur de tissus (Tissue-Tek VIP (<i>Sakura</i> , USA))
HistoStar (<i>Thermo Scientific</i> , USA)
Mollifex (<i>VWR</i> , USA)
Microtome (<i>Leica</i> , GE)
Superfrost plus (<i>VWR</i> , USA)
Tissue Stainer COT 20 (<i>Medite</i> , GE)
DPX mountant (<i>VWR</i> , USA)
Couvre-objets (<i>VWR</i> , USA)
Microscope (DM500, <i>Leica</i> , GE ; AX70, <i>Olympus</i> , GE)

propriété d'absorber toutes les protéines. Afin qu'il ne se fixe qu'au niveau de sa protéine spécifique, la membrane est saturée en protéines aspécifiques de l'anticorps. Pour cela, la membrane est mise en présence de la solution de blocage pendant 1h.

12.7. Révélation (Tableau II-25)

Pour la révélation, deux anticorps sont utilisés. L'anticorps primaire est spécifique de la protéine d'intérêt et est issu d'une espèce particulière. L'anticorps secondaire reconnaît quant à lui spécifiquement l'anticorps primaire en reconnaissant l'espèce de celui-ci et est porteur d'un fluorochrome.

L'anticorps primaire est préparé à la bonne dilution dans l'Odyssey Blocking Buffer avec 0,1% de Tween 20 et placé sur la membrane (Tableau II-26). L'incubation se fait sous agitation, soit pendant 1h à température ambiante, soit jusqu'au lendemain à 4°C. La membrane est ensuite rincée 4 fois 5 minutes dans du PBS contenant 0,1% de Tween 20 (PBS-Tween 0,1%). L'anticorps secondaire est lui aussi préparé à la bonne dilution dans l'Odyssey Blocking Buffer avec 0,1 % de Tween 20 et placé sur la membrane pendant 1h avec agitation (Tableau II-27). Après 4 rinçages de 5 minutes avec du PBS-Tween 0,1% et 2 rinçages de 5 minutes avec du PBS, la membrane peut être scannée soit humide soit sèche.

Afin de vérifier que les éventuelles différences d'abondance de la protéine d'intérêt ne sont pas dues à un problème de charge, la révélation se fait également pour une protéine contrôle, l'actine dans ce cas. Le protocole est le même que ci-dessus. Néanmoins, si le scan s'est réalisé à sec, il est nécessaire de réhydrater la membrane 1 min dans du méthanol, de la rincer 5 min dans du PBS et de la bloquer 1h avant de la mettre en présence de l'anticorps primaire.

13. Détection de l'activité de la β -galactosidase sur des organes

Une fois la souris tuée par dislocation cervicale, celle-ci est ouverte et les organes d'intérêt sont prélevés et placés dans 1 ml de PBS dans les puits d'une plaque 24-puits sur glace. Le PBS est remplacé par 1 ml de solution de fixation et les organes sont fixés pendant 30 min sur glace. Ensuite, les organes sont rincés 3 fois 15 min sur glace avec la solution de rinçage. Après ces trois rinçages, ils sont mis en présence de la solution de coloration et incubés toute la nuit à 37°C dans une atmosphère sans CO₂ en étant protégés de la lumière. Les organes sont alors rincés 3 fois dans du PBS et post-fixés dans de la paraformaldéhyde 4% à 4°C (Tableau II-28).

Les organes sont inclus en paraffine après avoir été déshydratés. Pour cela, ils passent par des bains successifs de méthanol de concentrations croissantes afin d'enlever leur contenu en eau. Avant de passer dans la paraffine, ils passent par des bains successifs de toluol qui est miscible avec celle-ci. Ces différentes étapes sont réalisées dans un système automatisé, le VIP permettant de les réaliser sous pression, à des températures standardisées et avec agitation. Les organes sont ensuite enrobés en paraffine. Les blocs obtenus sont dégrossis au microtome par tranches de 25 μ m. Pour cette étape et les organes épais, il faut prendre garde à ne pas aller trop loin dans le dégrossissage car la coloration ne pénètre pas bien. Ensuite, les blocs sont mis dans du Mollifex ce qui rend les tissus moins cassants et des coupes de 6 μ m sont réalisées et mises sur lame. Pour cela, une goutte d'eau est déposée sur la lame et ensuite la coupe y est étendue. La lame est ensuite placée sur un bloc chauffant pour étendre la coupe. Une fois que celle-ci est bien étendue, l'eau est éliminée et la lame mise à sécher. Pour bien fixer la paraffine sur la lame, elle est mise à 48°C pour minimum 1h (Tableau II-29).

Tableau II-30 : Coloration P.A.S. – Matériel

Liquide de Bouin	220 ml d'eau distillée 240 ml de formol 70 ml d'acide acétique 1,6 g d'acide picrique
Préparateur de tissus (TP1020 <i>Leica</i> , GE)	
HistoStar (<i>Thermo Scientific</i> , USA)	
Mollifex (<i>VWR</i> , USA)	
Microtome (<i>Leica</i> , GE)	
Superfrost plus (<i>VWR</i> , USA)	
Acide periodique 1%	1% d'acide periodique (<i>Sigma</i> , USA) Dilués dans de l'eau distillée
Réactif de Schiff	Pour 300 ml, dans de l'eau distillée - 3 g de pararosaniline (<i>Sigma</i>, USA) - 5,7 g Na₂O₅S₂ (<i>Merck</i>, GE) - 52,5 ml d'HCl (<i>Merck</i>, GE) Filtré avec du charbon activé (<i>Merck</i> , GE) jusqu'à ce que la solution soit incolore
HistoChoice Mounting Media (<i>Amresco</i> , USA)	
Couvre-objets (<i>VWR</i> , USA)	
Microscope (DM500, <i>Leica</i> , GE ; AX70, <i>Olympus</i> , GE)	

Tableau II-31 : Tests urinaires – Matériel

Fiske® Micro Osmometer Model 210 (<i>Fiske® Associates</i> , USA)
OneTouch® Vita® (<i>LifeScan Europe</i> , CH)
Creatinine colorimetric detection kit (<i>Enzo Life Sciences</i> , USA)

Afin de visualiser l'architecture générale des tissus, une coloration topographique est réalisée avec comme colorant l'érythrosine pour les éléments du cytoplasme et le safran pour les fibres conjonctives. La paraffine étant hydrophobe, il est nécessaire de déparaffiner les tissus. Pour cela, les lames passent dans des bains successifs de toluol, de méthanol et puis d'eau. Après quoi elles passent dans l'érythrosine pour 5 secondes puis dans les solutions de rinçage (eau-éthanol-isopropanol). Ces différentes étapes sont réalisées dans un système automatisé. Ensuite, les lames sont trempées dans le safran pour 1 min et puis dans les solutions de rinçage. Une fois la coloration terminée, un couvre-objet est placé sur la lame avec du DPX. Un petit poids est mis sur le couvre-objet afin de réduire l'épaisseur au maximum. Les lames peuvent alors être observées au microscope et des photos prises (Tableau II-29).

14. Coloration P.A.S. (Periodic Acid Schiff) (Tableau II-30)

La coloration P.A.S est une coloration spécifique mettant en évidence les polysaccharides comme le glycogène et les glycoprotéines. L'acide periodique oxyde ce qui forme des fonctions aldéhydes. Celles-ci réagissent avec le réactif de Schiff composé de fuscine décolorée ce qui forme un composé insoluble dans l'eau de couleur rouge.

Une fois la souris tuée par dislocation cervicale, celle-ci est ouverte et les organes d'intérêt sont prélevés. Les organes sont fixés dans le liquide de Bouin pour minimum 48h à 4°C. Les organes sont ensuite inclus puis enrobés en paraffine. Une fois les blocs obtenus, ils sont dégrossis au microtome par des tranches de 25 µm puis mis dans le Molliflex pour minimum 3h. Des coupes de 6 µm peuvent alors être réalisées et étendues sur lame. Les lames sont alors mises à 48°C pour minimum 1h.

Avant la coloration proprement dite, il est nécessaire de déparaffiner les tissus. Pour cela, les lames passent par différents bains : 5 min dans un 1^{er} bain de toluène, 5 min dans un 2^{ème} bain de toluène, passage dans trois bains successifs d'alcool, 10 min dans l'eau courante. Les lames sont ensuite rincées dans l'eau distillée. Ensuite, les lames sont mises dans l'acide periodique 1% pendant 8 minutes. Après avoir été rincée dans l'eau distillée, elles sont placées dans le réactif de Schiff pendant 2 minutes. Les lames sont rincées dans l'eau distillée puis dans l'eau courante pendant 10 minutes. Après être repassées dans l'eau distillée, les lames sont mises 45 secondes dans l'hémalum afin de marquer les noyaux. Les lames sont ensuite rincées dans l'eau distillée puis dans l'eau courante pendant 5 minutes et puis à nouveau dans l'eau distillée. Les lames sont alors placées dans le bleu de luxol pendant 2 minutes. Les lames passent alors dans trois bains d'alcool, dans un bain de butanol puis dans deux bains de toluène. Enfin, les lames sont montées avec un couvre-objet. Les lames peuvent alors être observées au microscope et des photos prises.

15. Tests urinaires (Tableau II-31)

15.1. Mise en cage métabolique

Afin de récolter leur urine, les souris sont placées individuellement en cage métabolique pour une durée de 24h. Les pots servant à récolter l'urine sont pesés avant et après la mise des souris dans la cage. La différence entre les deux poids nous indique le volume urinaire sur 24h.

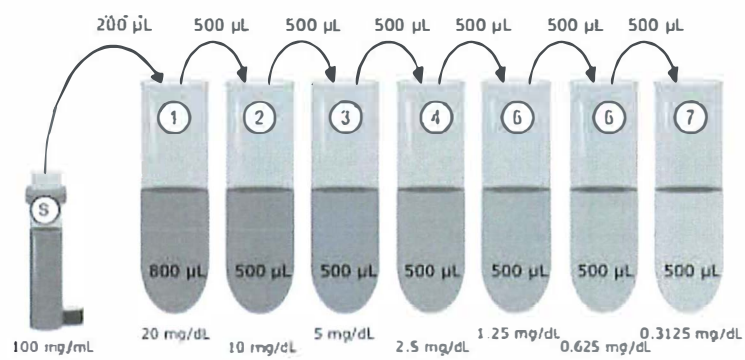


Figure II-5 : Dilutions s riees du standard.

15.2. Mesure de l'osmolarité

L'osmolarité (quantité de matière osmotiquement active dans 1 l de solution) des échantillons d'urine est déterminée grâce à un appareil qui se base sur l'abaissement cryoscopique de la solution. C'est une technique de cryoscopie qui permet l'étude du point de congélation d'une solution. L'abaissement cryoscopique diminue en fonction de la quantité de solutés présents dans la solution.

20 µl des échantillons d'urine dilués 10x sont placés au fond d'une cupule. Celle-ci est placée au niveau de l'appareil et la mesure est lancée. La valeur obtenue est en mOsm/kg d'urine.

15.3. Mesure du glucose

La mesure du glucose dans les échantillons est réalisée avec l'appareil utilisé par les diabétiques pour connaître leur glycémie. 3 à 4 µl d'échantillons d'urine sont déposés sur la languette placée dans l'appareil et la concentration en glucose est mesurée (mg/dl).

15.4. Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine urinaire est un dosage colorimétrique. Dans ce cas, il a été réalisé avec un kit qui se base sur la réaction de Jaffé.

Comme pour le dosage de la concentration en protéines, une courbe d'étalonnage est nécessaire afin de connaître la concentration en créatinine des différents échantillons. Cette courbe d'étalon est réalisée à partir d'une solution standard (100 mg/dl) fournie avec le kit. Grâce des dilutions sériée du standard, différentes solutions de différentes concentrations sont obtenues (Figure II-5).

50 µl des différentes concentrations du standard et des échantillons d'urine dilués 20x sont placés dans une plaque 96-puits, en duplicat. Le blanc correspond à 50 µl d'eau distillée. Ensuite, 100 µl de la solution de réaction du kit sont ajoutés dans les puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, la plaque est lue à 490 nm.

La droite d'étalonnage est réalisée via excel et de l'équation qui en découle ($y = ax + b$), la concentration des différents échantillons est déterminée, sachant que le « y » correspond à l'absorbance et le x à la concentration. Les échantillons ayant été dilués 20x, les résultats obtenus doivent être multipliés par 20.

16. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme *Sigma Plot* (USA). Le type de test statistique utilisé pour l'analyse des résultats est noté dans la légende des figures.

III. RESULTATS

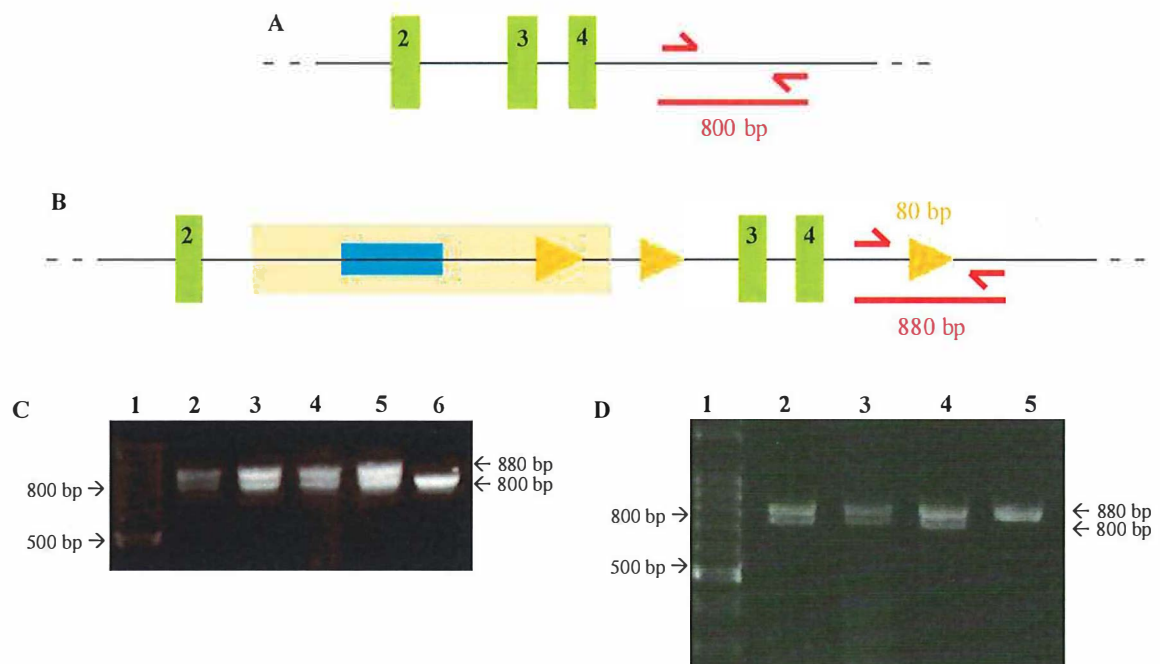


Figure III-1 : Génotypage quand la Cre recombinase n'est pas exprimée. (A et B) Représentation schématique d'une partie du gène de TMEM45A avec la présence du vecteur (B) ou non (A). Les trois premiers exons du gène de TMEM45A sont représentés en vert, le gène LacZ en bleu et les sites LoxP en jaune. Les amorces utilisées pour la PCR sont représentées en rouge. (C et D) Exemples de gels d'électrophorèse, avec le marqueur de poids moléculaire dans la 1^{ère} colonne. Les autres colonnes correspondent à différents échantillons à génotyper.

Génotypage

Lors des différentes expériences réalisées, nous avons comparé des individus (souris ou MEFs) sauvages (TMEM45A^{+/+}), hétérozygotes (TMEM45A^{+/-}) ou homozygotes (TMEM45A^{-/-}) pour TMEM45A. Pour prendre et utiliser les individus avec le génotype voulu, celui-ci doit être connu. Pour cela, des PCR avec des amorces spécifiques ont été réalisées, suivies d'électrophorèses permettant la visualisation des produits d'amplification.

En fonction de l'expression ou non de la Cre recombinase, les PCR à réaliser étaient différentes. Afin d'être sûr de l'invalidation du gène, des sites LoxP ont été ajoutés sur la séquence du vecteur ce qui permet qu'une partie de la séquence du gène de TMEM45A, dont le 3^{ème} et le 4^{ème} exons de TMEM45A, soit éliminée en présence de la Cre recombinase.

○ Quand la Cre recombinase n'est pas exprimée

Lorsque les souris ou les MEFs à génotyper proviennent d'un croisement de souris n'exprimant pas la Cre recombinase, le génotypage peut se faire uniquement avec la PCR utilisant les amorces LoxP. Ces amorces entourent le 3^{ème} site LoxP du vecteur. Ce site LoxP a une longueur de 80 paires de bases et n'est retrouvé que lorsque le vecteur s'est inséré dans le génome, c'est-à-dire que chez les individus TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{+/-}. Lorsque ce site LoxP n'est pas présent, les produits d'amplification de PCR ont une longueur de 800 paires de bases (Figure III-1A) alors qu'ils ont une longueur de 880 paires de bases lorsqu'il est présent (Figure III-1B).

Trois profils différents sont donc possibles sur le gel d'électrophorèse. La bande à 800 paires de bases sera retrouvée dans les échantillons provenant d'individus TMEM45A^{+/+} alors que celle à 880 paires de bases sera observée dans les échantillons provenant d'individus TMEM45A^{-/-}. Dans le cas des échantillons provenant d'individus TMEM45A^{+/-}, les deux bandes seront présentes étant donné qu'un allèle possède le vecteur et l'autre non.

Les figures III-1C et III-1D correspondent à des exemples de gels d'électrophorèse obtenus après une PCR avec les amorces LoxP. La 1^{ère} colonne de ces deux gels correspond au marqueur de poids moléculaire. Deux bandes sont observées pour les échantillons 2, 3, 4 et 5 de la figure 1C et pour les échantillons 2, 3 et 4 de la figure 1D, l'une à 800 paires de bases et l'autre à 880 paires de bases. Il s'agit donc d'échantillons TMEM45A^{+/-}. En ce qui concerne l'échantillon 6 de la figure 1C, une seule bande est observée. Celle-ci réfère à des produits d'amplification de 800 paires de bases. L'échantillon 6 correspond donc à un échantillon TMEM45A^{+/+}. Enfin, l'échantillon 5 de la figure 1D correspond à un échantillon TMEM45A^{-/-} puisqu'une seule bande est observée à 880 paires de bases.

○ Quand la Cre recombinase est exprimée

Quand les souris utilisées pour les croisements expriment la Cre recombinase, la PCR LoxP n'est plus suffisante pour connaître le génotype des souriceaux ou des MEFs. En effet, lorsque la Cre recombinase est exprimée, ce qui se trouve entre les sites LoxP est enlevé de la séquence. Cela a pour conséquence que l'une des amorces entourant le site LoxP ne sait plus s'hybrider sur la séquence et donc la PCR ne donne plus de produits d'amplification. Cela se traduit sur le gel d'électrophorèse par l'absence de bande lorsque le vecteur s'est inséré. Les échantillons TMEM45A^{+/+} qui n'ont pas le vecteur dans leur séquence ont donc une bande à 800 paires de bases (Figure III-2A) et les individus TMEM45A^{-/-} chez qui le vecteur s'est inséré aucune bande

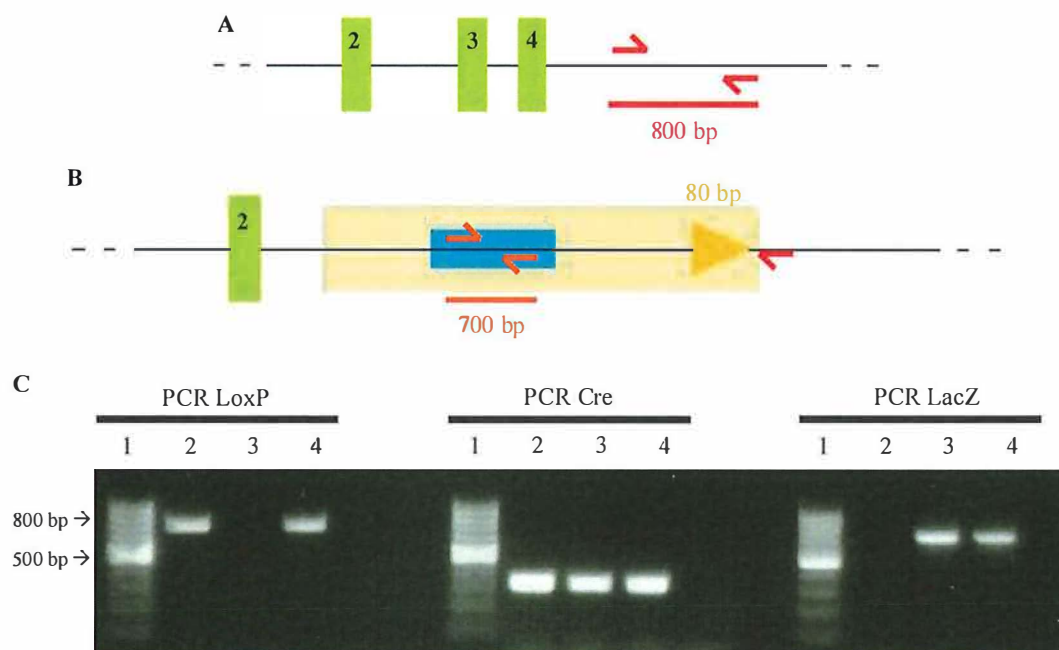


Figure III-2 : Génotypage quand la Cre recombinase est exprimée. (A et B) Représentation schématique d'une partie du gène de TMEM45A avec la présence du vecteur (B) ou non (A). Les trois premiers exons du gène de TMEM45A sont représentés en vert, le gène LacZ en bleu et les sites LoxP en jaune. Les amorces utilisées pour la PCR LoxP sont représentées en rouge et celles pour la PCR LacZ en orange. (C) Exemple d'un gel d'électrophorèse, avec le marqueur de poids moléculaire dans les colonnes n°1. Les autres colonnes correspondent à différents échantillons à génotyper.

(Figure III-2B). Cependant, un problème se pose pour les échantillons TMEM45A^{+/-} qui ont un allèle où le vecteur s'est inséré et un allèle normal. Sur l'électrophorèse, cela se traduit par le même profil que les échantillons TMEM45A^{+/+}. Les échantillons TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{+/-} ne sont donc plus distingués les uns des autres.

Pour contrer ce problème, deux autres PCR sont réalisées en parallèle de celle avec les amorces entourant le site LoxP. L'une utilise des amorces pour la Cre recombinase ce qui permet de savoir si la séquence codant pour celle-ci se trouve dans le génome. La deuxième se fait avec des amorces reconnaissant la séquence du gène LacZ (Figure III-2B). Cette deuxième PCR permet donc de dire si le vecteur s'est inséré ou non puisque le gène LacZ ne se retrouve que dans celui-ci.

Trois profils différents sont donc possibles sur le gel d'électrophorèse. Une bande à 800 paires de bases pour la PCR LoxP et une bande pour la PCR Cre seront observées dans les échantillons provenant d'individus TMEM45A^{+/+} mais aucune bande pour la PCR LacZ. Une bande à 800 paires de bases pour la PCR LoxP, une bande pour le PCR Cre et une bande pour la PCR LacZ seront retrouvées dans les échantillons provenant d'individus TMEM45A^{+/-}. Les échantillons provenant d'individus TMEM45A^{-/-} présentent quant à eux aucune bande pour la PCR LoxP, une bande pour la PCR Cre et une bande pour la PCR LacZ.

La figure III-2C correspond à un exemple de gel d'électrophorèse obtenu après trois PCR avec les amorces LoxP, Cre et LacZ. Les colonnes portant le numéro 1 correspondent au marqueur de poids moléculaire. Pour l'échantillon 2, une bande est observée pour la PCR LoxP et pour la PCR Cre mais aucune bande n'apparaît pour la PCR LacZ. L'échantillon 2 correspond donc à un individu TMEM45A^{+/+}. L'échantillon 3 donne un exemple de ce qui est observé pour un individu TMEM45A^{+/-} : aucune bande pour la PCR LoxP alors qu'une bande est observée pour la PCR Cre et la PCR LacZ. Enfin, l'échantillon 4 correspond à un individu TMEM45A^{+/-} étant donné qu'une bande est observée pour chacune des trois PCR.

Une fois que la Cre recombinase a recombiné, ce qui a été enlevé (dont le 3^{ème} et 4^{ème} exons de TMEM45A) est éliminé définitivement. Cela fait que lors de croisement ultérieur, il est possible que la Cre recombinase ne soit plus présente mais la séquence reste « raccourcie ». Néanmoins, les profils d'électrophorèse restent les mêmes que lorsqu'elle est exprimée, sauf pour la PCR Cre qui est négative.

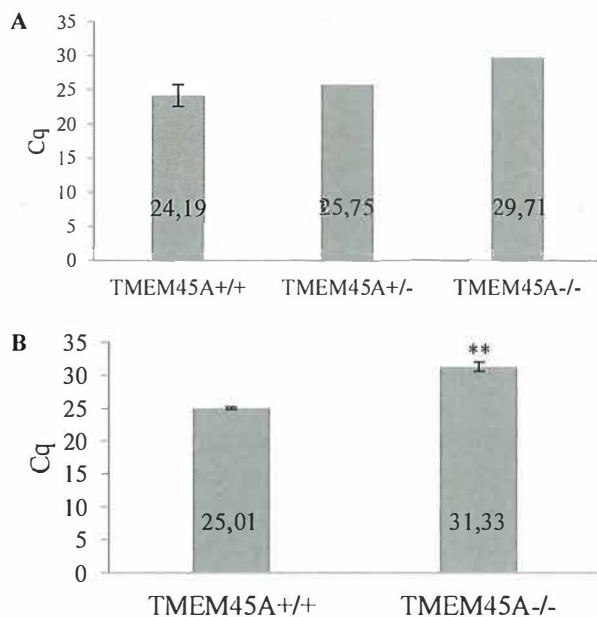


Figure III-3 : Expression en ARN_m de TMEM45A. L'ARN total a été extrait de MEFs exprimant (B) ou non (A) la Cre recombinase et l'ARN_m le composant rétro-transcrit en ADN_c. Une PCR en temps réel a ensuite été réalisée avec des amorces spécifiques pour TMEM45A. Les résultats sont représentés en Cq, en tant que moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3 sauf en A pour TMEM45A^{+/-} et TMEM45A^{-/-} où n=2). Test statistique : ANOVA 1 (A) et test de Student (B). ** = significativement différent du contrôle (TMEM45A^{+/+}) (p<0,01).

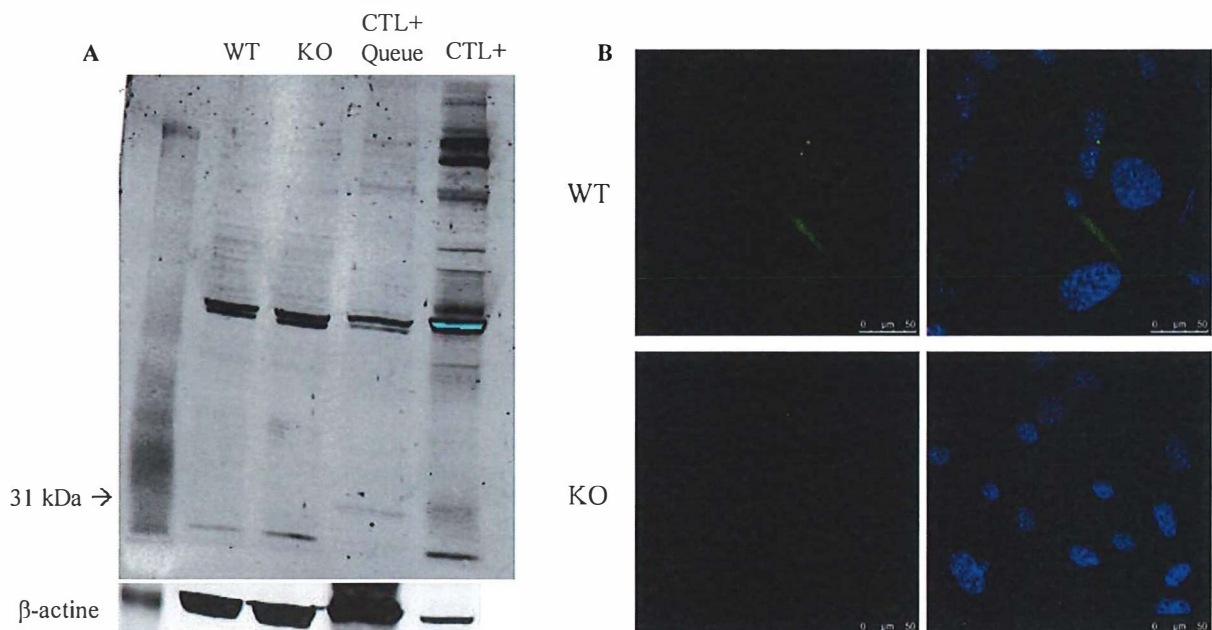


Figure III-4 : Expression protéique de TMEM45A. (A) **Western-Blot.** Après l'extraction protéique de MEFs TMEM45A^{+/+} (WT) et TMEM45A^{-/-} (KO), un western-blot a été réalisé afin de révéler TMEM45A. Les contrôles positifs correspondent à la peau de souris TMEM45A^{+/+} (CTL+ Queue) et à des cellules transfectées avec un vecteur contenant la séquence de TMEM45A (CTL+). Le contrôle de charge de l'expérience est la β-actine. (B) **Immunofluorescence.** Des MEFs TMEM45A^{+/+} (WT) et TMEM45A^{-/-} (KO) ont été fixés, perméabilisés et ensuite marqués avec un anticorps reconnaissant TMEM45A, lui-même reconnu par un anticorps conjugué à un fluorochrome vert. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst et apparaissent en bleu. L'observation des cellules a été réalisée au microscope confocal.

Première partie : Expériences *in vitro*

1. Expression de TMEM45A dans les MEFs

TMEM45A est connu pour être exprimé dans les kératinocytes différenciés (Hayez et al., 2014) et dans certaines cellules cancéreuses (Flamant et al., 2012), mais nous ne savons pas si ce gène l'est dans les MEFs, le modèle cellulaire de ce travail. Il est donc nécessaire d'évaluer l'expression de TMEM45A dans ce type cellulaire.

1.1. Analyse de l'expression de TMEM45A en normoxie

Le génotypage nous permet de savoir si le vecteur est présent ou non dans le génome des MEFs. Afin de vérifier si la présence du vecteur dans le génome entraîne bien une diminution de l'expression en ARN_m de TMEM45A, des PCR en temps réel ont été réalisées sur des MEFs des différents génotypes. Cela a tout d'abord été réalisé sur des MEFs TMEM45A^{+/+}, TMEM45A^{+/-} et TMEM45A^{-/-} n'exprimant pas la Cre recombinase (Figure III-3A). Les résultats sont présentés par les valeurs de Cq (quantification cycle) obtenues à la fin des PCR en temps réel. Plus les valeurs de Cq sont grandes, moins le gène étudié est exprimé. Les valeurs de Cq des MEFs TMEM45A^{+/-} sont plus grandes que celles des MEFs TMEM45A^{+/+} (différence de 1,56 Cq). Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative. L'augmentation de la valeur de Cq est plus marquée entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} avec une différence de 5,52 Cq, qui est statistiquement significatif. Ces résultats suggèrent que l'expression en ARN_m de TMEM45A est moins importante dans les MEFs TMEM45A^{-/-} par rapport aux MEFs TMEM45A^{+/+}. Des PCR en temps réel ont également été réalisées sur des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase (Figure III-3B). À nouveau, les valeurs de Cq sont plus significativement augmentées dans les MEFs TMEM45A^{-/-} par rapport aux MEFs TMEM45A^{+/+}, avec une différence de 6,32 Cq. L'expression en ARN_m de TMEM45A est donc nettement moindre (environ 2⁶ fois moindre) dans les MEFs TMEM45A^{-/-} par rapport aux MEFs TMEM45A^{+/+}.

L'expression de TMEM45A a également été évaluée au niveau protéique dans des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase. Les résultats du western-blot sont présentés à la figure III-4A. Aucune bande n'est observée à environ 31 kDa sur la membrane de western-blot pour les extraits protéiques des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}. Pour ce même poids moléculaires, une bande (de faible intensité) est observée pour chacun des contrôles positifs. Ceux-ci correspondent à l'extrait protéique d'une queue de souris TMEM45A^{+/+} et à l'extrait protéique de cellules transfectées avec un vecteur contenant TMEM45A. Il faut également noter que de nombreuses bandes aspécifiques sont révélées.

La figure III-4B correspond aux résultats du marquage de TMEM45A en immunofluorescence. Comme pour le western-blot, TMEM45A n'est détecté ni dans les MEFs TMEM45A^{+/+}, ni dans les MEFs TMEM45A^{-/-}. En effet, un léger signal vert apparaît mais cela correspond à du bruit de fond. Ces résultats indiquent que nous n'avons pas été capables de mettre en évidence l'expression protéique de TMEM45A dans les MEFs. Étant donné que l'ARN_m a été détecté, cela est probablement dû à une trop faible expression de la protéine que pour être détectée par les deux techniques utilisées dans les MEFs TMEM45A^{+/+}.

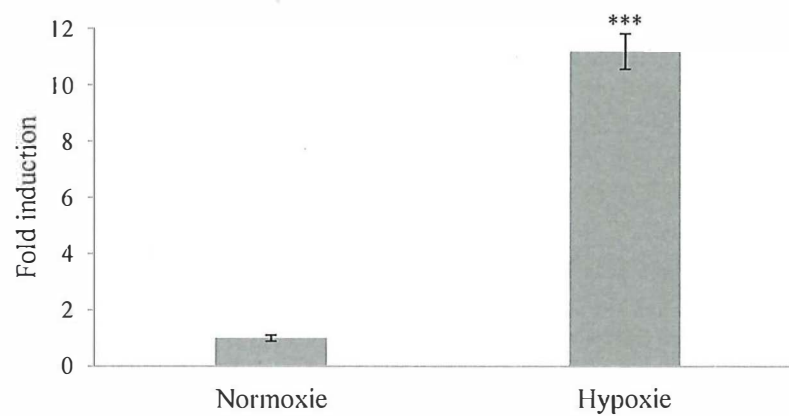


Figure III-5 : Expression de TMEM45A en normoxie et en hypoxie. Des MEFs TMEM45A^{+/+} ont été incubés en normoxie (N) ou en hypoxie (H) pour 24h. L'ARN total a alors été extrait et l'ARN_m le composant rétro-transcrit en ADN_c. Une PCR quantitative en temps réel a ensuite été réalisée avec des amorces spécifiques pour TMEM45A. Les valeurs de Cq de TMEM45A ont été normalisées avec les valeurs de Cq de PPIE (house keeping gene). Les résultats sont représentés en Fold-induction (moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats). Test statistique : Test de Student. *** = significativement différent du contrôle ($p < 0,001$).

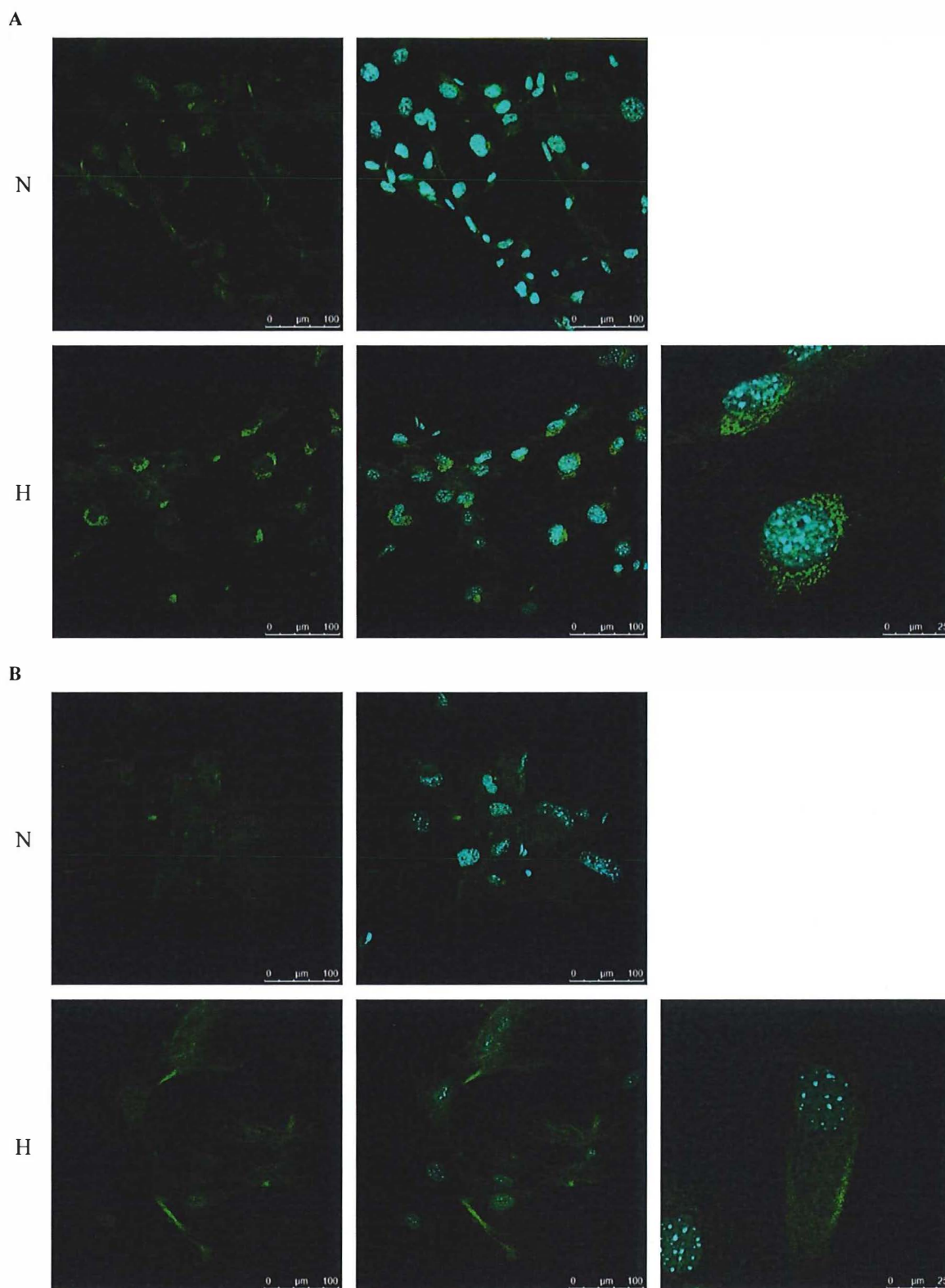
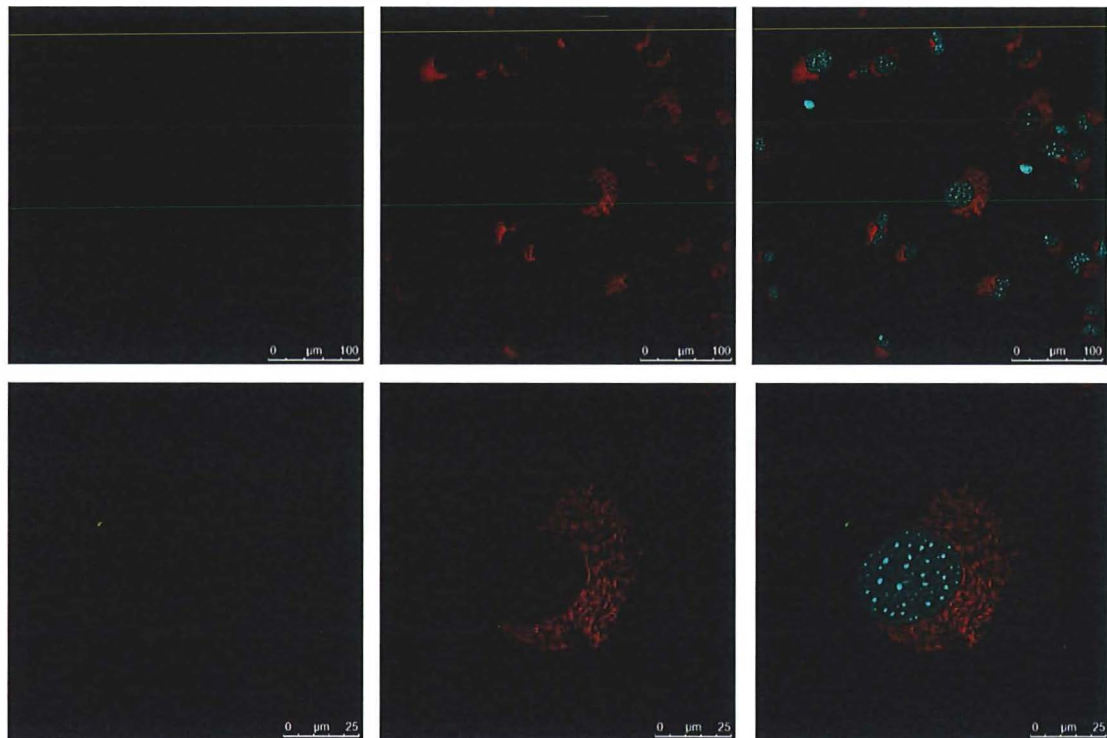


Figure III-6 : Expression protéique de TMEM45A en normoxie et en hypoxie. Des MEFs TMEM45A^{+/+} (A) et TMEM45A^{-/-} (B) ont été incubés en normoxie (N) ou en hypoxie (H) pendant 24h. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps reconnaissant TMEM45A, lui-même reconnu par un anticorps conjugué à un fluorochrome vert. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst et apparaissent en bleu. L'observation des cellules a été réalisée au microscope confocal.

A



B

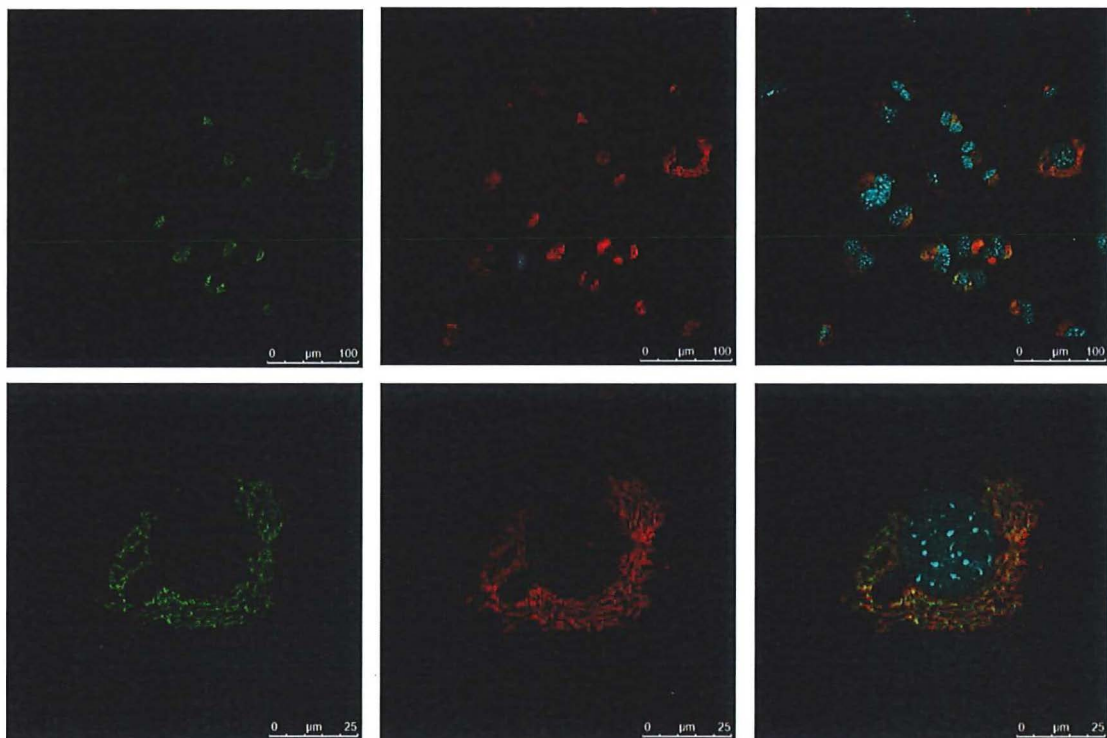


Figure III-7 : Co-marquage pour TMEM45A et GM130. Des MEFs TMEM45A^{+/+} ont été incubés en normoxie (A) ou en hypoxie (B) pendant 24h. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps reconnaissant TMEM45A, lui-même reconnu par un anticorps conjugué à un fluorochrome vert et un anticorps reconnaissant GM130 lui-même reconnu par un anticorps conjugué à un fluorochrome rouge. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst et apparaissent en bleu. L'observation des cellules a été réalisée au microscope confocal.

1.2. Analyse de l'expression de TMEM45A en hypoxie

N'ayant pas pu montrer l'expression protéique de TMEM45A dans les MEFs en normoxie, nous avons évalué son expression dans les MEFs incubés en hypoxie. En effet, le gène TMEM45A est connu pour être un gène cible du facteur de transcription HIF-1 actif en conditions d'hypoxie (Benita et al., 2009).

L'effet de l'hypoxie sur l'expression de TMEM45A a tout d'abord été évalué sur l'expression en ARN_m de TMEM45A. Pour cela, une PCR en temps réel a été réalisée à partir d'ARN extrait de MEFs TMEM45A^{+/+} exprimant la Cre recombinase, incubés en normoxie ou en hypoxie pendant 24h. Une diminution statistiquement significative des valeurs de C_q est observée lorsque les MEFs ont été incubés en hypoxie par rapport aux MEFs incubés en normoxie, respectivement de 21,9 C_q et de 25,3 C_q ce qui se traduit par une forte augmentation de l'expression de TMEM45A (exprimée en fold induction) (Figure III-5).

Au vu de cette augmentation d'expression en ARN_m de TMEM45A dans des MEFs incubés en hypoxie, un marquage pour TMEM45A en immunofluorescence a été réalisé sur des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase, incubés en normoxie ou en hypoxie pendant 24h. Pour les MEFs TMEM45A^{+/+} (Figure III-6A), un signal vert correspondant à TMEM45A apparaît lorsque les cellules ont été incubées en hypoxie. De plus, il peut être observé que ce signal vert est granulaire et se concentre dans une zone à proximité du noyau (zone périnucléaire). Cette augmentation du signal vert autour du noyau n'est pas observée pour les MEFs TMEM45A^{-/-} incubés en hypoxie (Figure III-6B).

Les résultats indiquent que l'hypoxie induit fortement l'expression de TMEM45A.

1.3. Localisation de TMEM45A dans les MEFs

Récemment, il a été montré, dans des kératinocytes en culture, que TMEM45A co-localise avec la golgin-97, une protéine du réseau trans-golgien. De plus, bien qu'aucune co-localisation entre TMEM45A et GM130, une protéine de matrice du réseau cis-golgien n'ait été observée, la localisation de TMEM45A et celle de GM130 semblent s'imbriquer l'un l'autre (Hayez et al., 2014).

Tenant compte de ces résultats de la littérature et du fait que TMEM45A ait été observé dans une zone périnucléaire dans les MEFs TMEM45A^{+/+} incubés en hypoxie, nous avons réalisé un co-marquage pour TMEM45A et GM130 sur des MEFs TMEM45A^{+/+} exprimant la Cre recombinase incubés en normoxie ou en hypoxie pendant 24h. En normoxie, GM130 est observé dans la zone périnucléaire des MEFs alors que TMEM45A n'est pas observé (Figure III-7A). Par contre en hypoxie, ces deux protéines sont observées dans la zone périnucléaire (Figure III-7B). En zoomant sur cette zone, aucune co-localisation stricte de GM130 et TMEM45A n'est observée. En effet, si ces deux protéines co-localisaient, un signal jaune apparaîtrait ce qui n'est pas le cas ici. Néanmoins, les deux signaux (rouge et vert) sont très proches l'un de l'autre, comme s'ils s'emboîtaient l'un l'autre. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Hayez et al., 2014) et suggèrent une probable localisation de TMEM45A au niveau de l'appareil de Golgi.

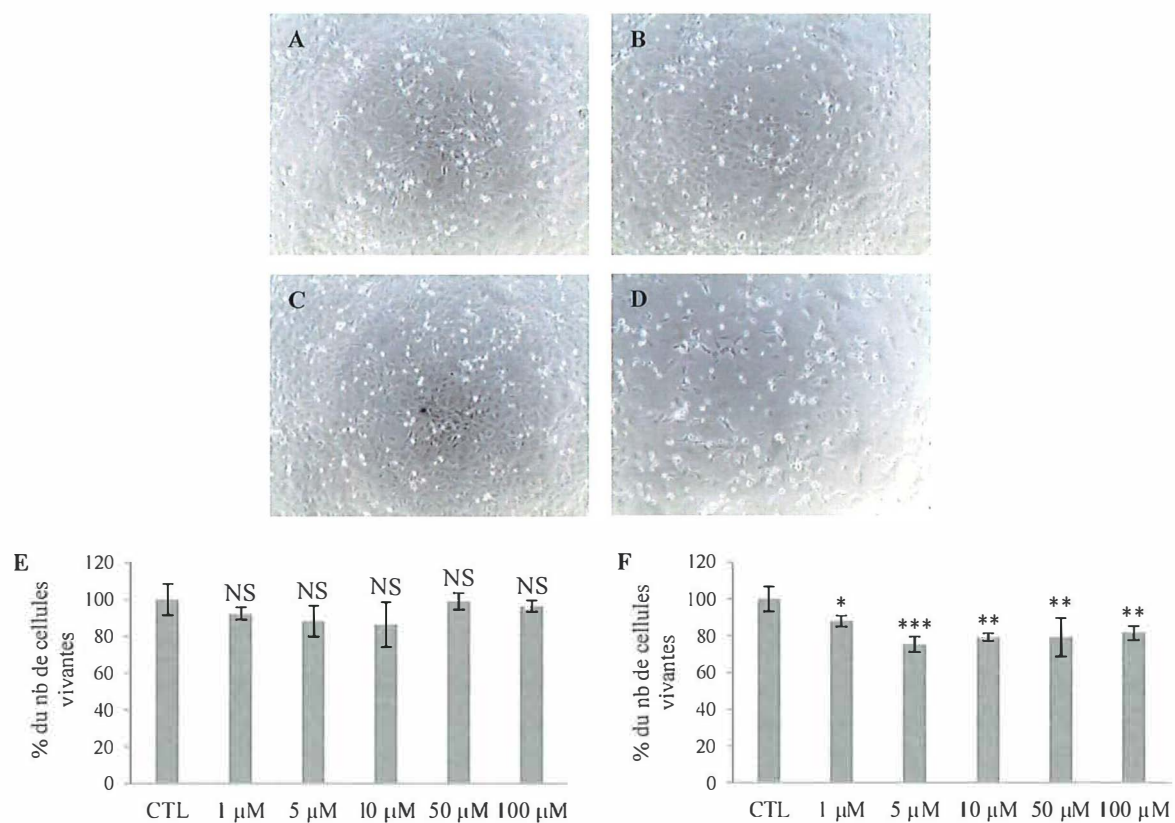


Figure III-8 : Effet de l'étoposide sur la viabilité des MEFs. Des MEFs TMEM45A^{+/+} ont été incubés sans (CTL) ou en présence de différentes concentrations d'étoposide pendant 16h (A, B et E) ou 24h (C, D et F). (A à D) Après le temps d'incubation, les cellules ont été observées au microscope à contraste de phase. Les photos A et C montrent les MEFs incubés sans étoposide et les photos B et D, les MEFs incubés avec 100 μM d'étoposide. (E et F) Un test MTT a ensuite été réalisé. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées sans étoposide et représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats. Test statistique : ANOVA 1. NS = non significativement différent du contrôle ; * = significativement différent du contrôle ($p < 0,05$) ; ** = significativement différent du contrôle ($p < 0,01$) ; *** = significativement différent du contrôle ($p < 0,001$).

2. Étude de la mort des MEFs induite par des agents anticancéreux

2.1. Quel agent anticancéreux pour induire la mort des MEFs ?

Un des objectifs de ce travail était d'examiner la sensibilité de MEFs TMEM45A^{-/-} à la mort induite par un agent chimiothérapeutique par rapport à des MEFs TMEM45A^{+/+}. La première chose à faire était donc de trouver un agent chimiothérapeutique efficace pour induire la mort des MEFs.

○ Effets de l'étoposide sur la viabilité des MEFs

Afin d'induire la mort des MEFs, l'étoposide a tout d'abord été testé. L'étoposide a été choisi car il a été montré que TMEM45A est impliqué dans la résistance des cellules HepG2 à cet agent chimiothérapeutique (Flamant et al., 2012). L'étoposide est un agent anticancéreux dérivé des podophyllotoxines et utilisé dans le traitement de différents types de tumeurs. Il s'agit d'un inhibiteur de la topoisomérase-2, une enzyme contrôlant la structure topologique de l'ADN et jouant un rôle pendant la réplication et la transcription de l'ADN (van Maanen et al., 1988). L'étoposide stabilise les complexes formés entre l'enzyme et l'ADN, ce qui induit des cassures double brin dans l'ADN (Karpnich et al., 2002). Les dommages à l'ADN mènent à la mort des cellules par apoptose.

Pour étudier l'effet de l'étoposide sur les MEFs, des MEFs TMEM45A^{+/+} n'exprimant pas la Cre recombinase ont été mis en présence de différentes concentrations de cet agent chimiothérapeutique pendant 16h ou 24h. Après le temps d'incubation, la morphologie des MEFs a été observée au microscope à contraste de phase. Après 16h d'incubation (Figures III-8A et III-8B), la morphologie ainsi que la densité des MEFs incubés en présence de 100 μ M d'étoposide, la concentration la plus haute utilisée, sont assez comparables à celles des MEFs incubés sans étoposide. Après 24h d'incubation (Figures III-8C et III-8D), la quantité de MEFs semble moins importante incubée en présence de 100 μ M d'étoposide par rapport à la quantité de MEFs incubée sans étoposide. Afin de quantifier ces observations, un test MTT a été réalisé permettant d'évaluer le nombre de cellules vivantes. Après 16h d'incubation, aucun effet de l'étoposide n'est observé (Figure III-8E). Après 24h d'incubation en présence d'étoposide, une légère diminution du nombre de cellules vivantes est observée pour les différentes concentrations testées (Figure III-8F), ce qui est cohérent avec les observations en microscopie des cellules. Bien que ces diminutions soient statistiquement significative, elles restent faibles et cela même pour 100 μ M d'étoposide. En effet, le pourcentage du nombre de cellules vivantes avec une concentration de 100 μ M pendant 24h est encore de 82%. Nous pouvons donc conclure que les MEFs ne sont pas sensibles à l'étoposide.

○ Effets de la doxorubicine sur la viabilité des MEFs

Étant donné que nous n'avons pas induit la mort des MEFs en présence d'étoposide, nous avons fait des recherches dans la littérature afin de trouver un agent chimiothérapeutique efficace pour induire la mort des MEFs. Différents éléments sont ressortis de ces recherches en faveur de la doxorubicine comme agent chimiothérapeutique induisant la mort des MEFs. D'une part, la doxorubicine induit une diminution du nombre de MEFs vivants (Park et al., 2012). De plus, cette diminution du nombre de MEFs vivants est apparue plus importante avec la doxorubicine, comparée à celle induite par deux autres agents chimiothérapeutiques, la cisplatine et l'étoposide (Wang et al., 2006). D'autre part, la doxorubicine semble induire l'apoptose des MEFs. En effet, la doxorubicine a été montrée comme induisant le clivage de PARP et le clivage

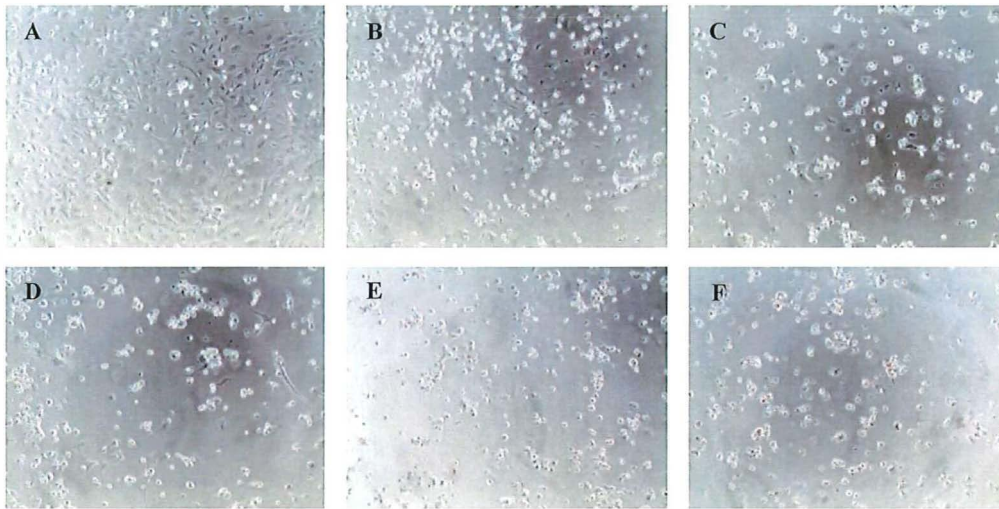


Figure III-9 : Morphologie des MEFs après incubation en présence de doxorubicine. Des MEFs TMEM45A^{+/+} ont été incubés sans ou en présence de différentes concentrations de doxorubicine. Après l'incubation de 24h, les cellules ont été observées au microscope à contraste de phase. (A) : CTL ; (B) : 1 μ M ; (C) : 5 μ M ; (D) : 10 μ M ; (E) : 25 μ M ; (F) : 50 μ M.

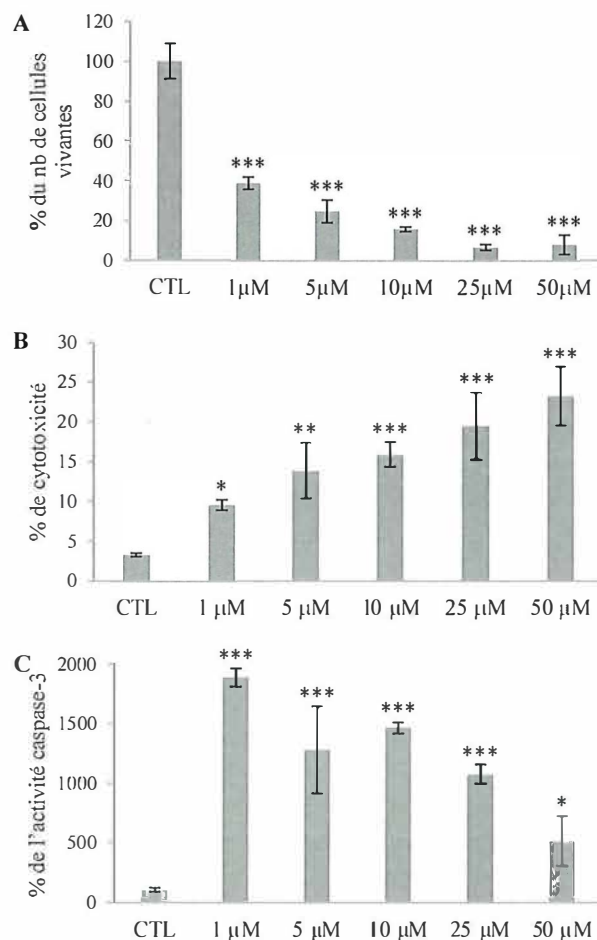


Figure III-10 : Effet de la doxorubicine sur la viabilité des MEFs. Des MEFs TMEM45A^{+/+} ont été incubés sans (CTL) ou en présence de différentes concentrations de doxorubicine pendant 24h. Un test MTT (A), une mesure du relargage de LDH (B), et un test de l'activité caspase-3 (C) ont ensuite été réalisés. Pour le test MTT et le test de l'activité caspase-3, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées sans doxorubicine. Pour les trois tests, les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats.

Test statistique : ANOVA 1. NS = non significativement différent du contrôle ; * = significativement différent du contrôle ($p < 0,05$) ; ** = significativement différent du contrôle ($p < 0,01$) ; *** = significativement différent du contrôle ($p < 0,001$).

de la caspase-3 (Wang et al., 2012) et comme augmentant le nombre de cellules positives pour l'annexine-V, marqueur de l'externalisation de la phosphatidylsérine induite en cours d'apoptose (Yang et al., 2014).

La doxorubicine fait partie de la famille des anthracyclines et est utilisé dans le traitement d'un certain nombre de cancers, dont les cancers du sein, des poumons, des ovaires,... (Thorn et al., 2011). Les anthracyclines sont largement utilisées pour le traitement des cancers mais leurs mécanismes d'action restent un sujet de controverse. En effet, différents mécanismes d'action sont considérés : inhibition de la synthèse des macromolécules dont l'ADN, génération de radicaux libres, inhibition de la topoisomérase-2,... (Gewirtz, 1999) ; (Minotti et al., 2004).

La doxorubicine a donc été testée sur des MEFs TMEM45A^{+/+} n'exprimant pas la Cre recombinase. Pour cela, ces MEFs ont été incubés en présence de différentes concentrations de doxorubicine pendant 24h. Après ce temps d'incubation les cellules ont été observées au microscope afin d'analyser la morphologie et la densité des cellules en culture (Figure III-9). La densité des MEFs incubés en présence de doxorubicine est moins importante que celle des MEFs incubés sans doxorubicine. De plus, la morphologie des MEFs incubés en présence de doxorubicine est différente des MEFs incubés sans doxorubicine. Alors que les MEFs contrôles apparaissent étalés, aplatis, les MEFs incubés en présence de doxorubicine ont une apparence plus ronde suggérant la mort des cellules. Afin de confirmer ces observations, trois tests différents ont été réalisés : un test MTT permettant d'évaluer le nombre de cellules vivantes, une mesure du relargage de la LDH évaluant la cytotoxicité et un test de l'activité caspase-3 permettant une évaluation de l'apoptose. En ce qui concerne le pourcentage du nombre de cellules vivantes, une diminution de celui est observée pour les MEFs incubés en présence de doxorubicine par rapport aux MEFs incubés sans doxorubicine (Figure III-10A). Cette diminution est déjà significative avec une concentration de doxorubicine de 1 μ M, avec une diminution de 61%. De plus, la toxicité augmente en fonction de la concentration en doxorubicine. La mort cellulaire évaluée par la mesure du relargage de la LDH passe de 3,30% pour les MEFs contrôles à 9,49% pour les MEFs incubés en présence de 1 μ M de doxorubicine (Figure III-10B). Cette augmentation est significative ce qui suggère la mort des MEFs et cela déjà en présence de 1 μ M. À nouveau, on observe un effet dépendant de la concentration. En parallèle, une augmentation significative du pourcentage de l'activité caspase-3 est observée pour les MEFs incubés en présence 1 μ M de doxorubicine par rapport aux MEFs incubés sans doxorubicine (Figure III-10C). Pour les concentrations plus élevées utilisées, l'activité caspase-3 n'augmente pas plus et l'augmentation observée est même moins importante qu'en présence de 1 μ M. Deux explications à ces observations sont possibles : en présence de concentrations de doxorubicine plus élevées, l'apoptose était induite plus tôt ou les cellules mouraient par nécrose plutôt que par apoptose.

De ces résultats, nous avons décidé de continuer les expériences sur les MEFs avec une incubation en présence de 1 μ M de doxorubicine pendant 24h. En effet, cette concentration et ce temps d'incubation ont été montrés suffisants pour induire une mort significative des MEFs.

2.2. Effets de la doxorubicine sur la viabilité des MEFs en fonction de leur génotype

Afin de voir si les MEFs TMEM45A^{-/-} sont plus sensibles à la mort induite par la doxorubicine, une première série de MEFs n'exprimant pas la Cre recombinase (MEFs TMEM45A^{+/+}, TMEM45A^{+/-} et TMEM45A^{-/-}) a été incubée en présence de 1 μ M de doxorubicine pendant 24h. Ensuite, un test MTT, une mesure du relargage de la LDH et un test de l'activité caspase-3 ont été réalisés. Les résultats de ces trois tests pour les trois lignées de MEFs sont

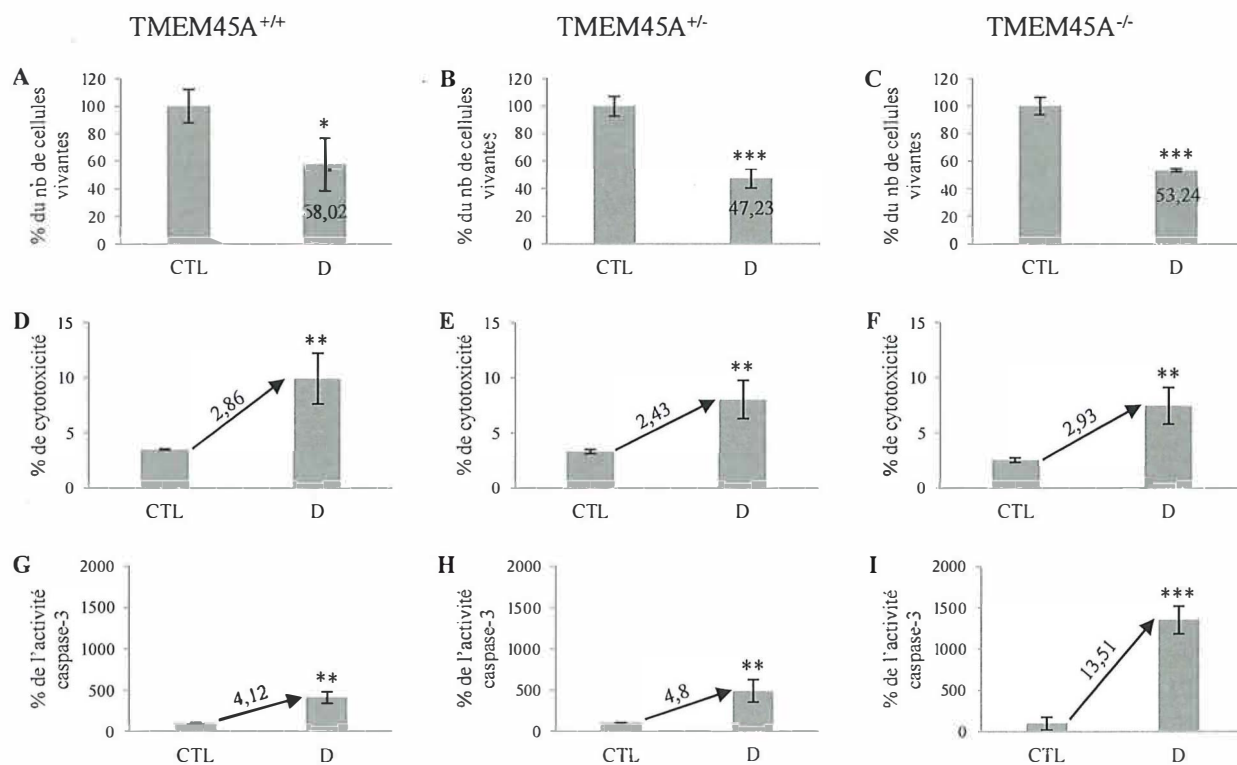


Figure III-11 : Effet de la doxorubicine sur la viabilité de MEFs TMEM45A^{+/+}, TMEM45A^{+/-} et TMEM45A^{-/-} n'exprimant pas la Cre recombinase. Des MEFs TMEM45A^{+/+} (A, D et G), TMEM45A^{+/-} (B, E et H) et TMEM45A^{-/-} (C, F et I) ont été incubés sans (CTL) ou en présence de 1 μ M de doxorubicine (D) pendant 24h. Un test MTT (A à C), une mesure du relargage de LDH (D à F), et un test de l'activité caspase-3 (G à I) ont ensuite été réalisés. Pour le test MTT et le test de l'activité caspase-3, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées sans doxorubicine. Pour les trois tests, les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats.

Test statistique : Test de student. NS = non significativement différent du contrôle ; * = significativement différent du contrôle ($p < 0,05$) ; ** = significativement différent du contrôle ($p < 0,01$) ; *** = significativement différent du contrôle ($p < 0,001$).

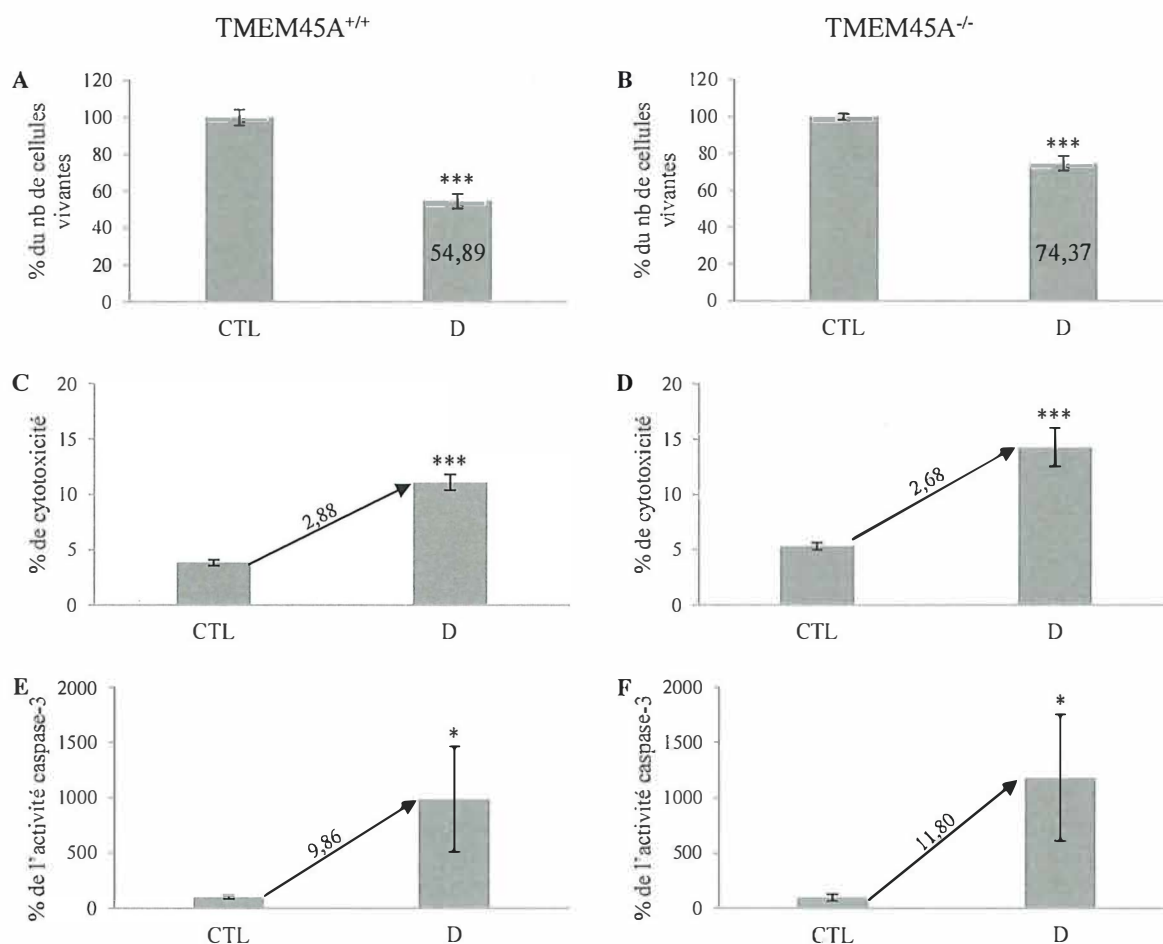


Figure III-12 : Effet de la doxorubicine sur la viabilité de MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} n'exprimant pas la Cre recombinase. Des MEFs TMEM45A^{+/+} (A à C) et TMEM45A^{-/-} (D à F) ont été incubés sans (CTL) ou en présence de 1 μ M de doxorubicine (D) pendant 24h. Un test MTT (A et D), une mesure du relargage de LDH (B et E), et un test de l'activité caspase-3 (C et F) ont ensuite été réalisés. Pour le test MTT et le test de l'activité caspase-3, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées sans doxorubicine. Pour les trois tests, les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats.

Test statistique : Test de Student. * = significativement différent du contrôle ($p < 0,05$) ; *** = significativement différent du contrôle ($p < 0,001$).

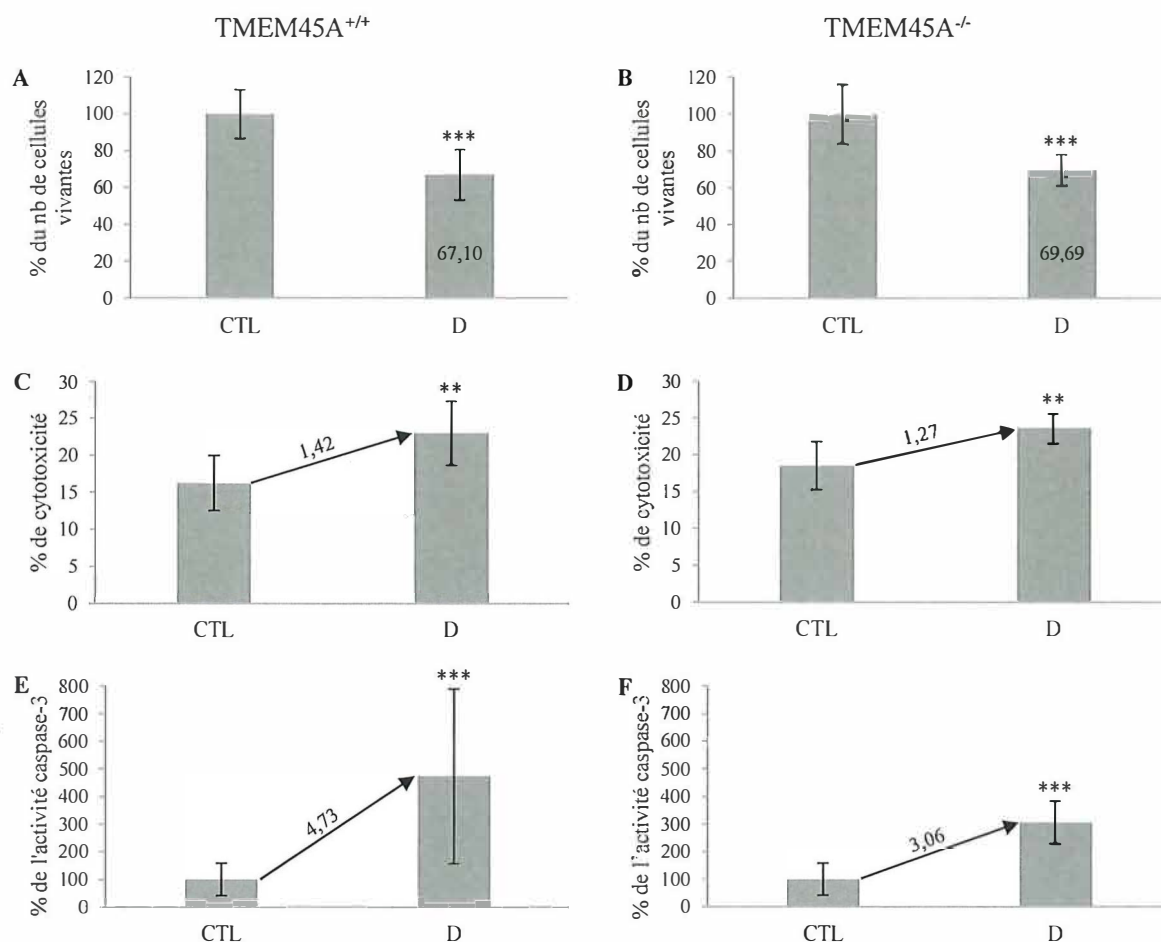


Figure III-13 : Effet de la doxorubicine sur la viabilité de MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase. Des MEFs TMEM45A^{+/+} (A à C) et TMEM45A^{-/-} (D à F) exprimant la Cre recombinase ont été incubés sans (CTL) ou en présence de 1 μ M de doxorubicine (D) pendant 24h. Un test MTT (A et D), une mesure du relargage de LDH (B et E), et un test de l'activité caspase-3 (C et F) ont ensuite été réalisés. Pour le test MTT et le test de l'activité caspase-3, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées sans doxorubicine. Pour les trois tests, les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3).

Test statistique : Test de Student. ** = significativement différent du contrôle (p<0,01) ; *** = significativement différent du contrôle (p<0,001).

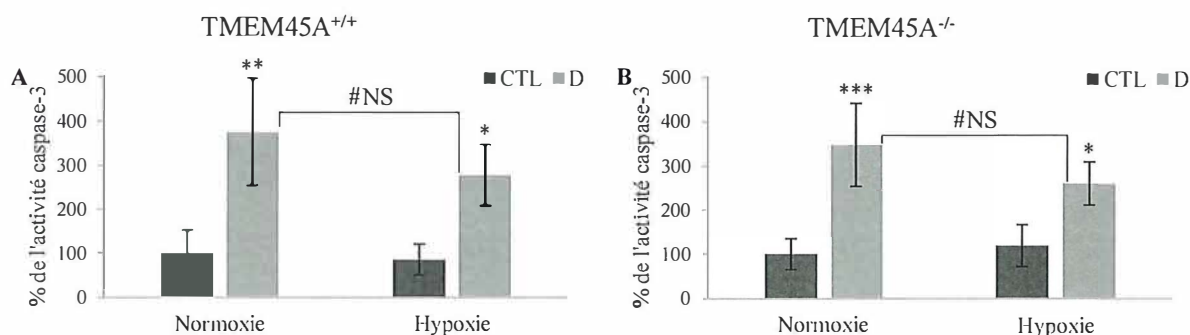


Figure III-14 : Effet de la doxorubicine sur l'activité caspase de MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase et incubés en hypoxie. Des MEFs TMEM45A^{+/+} (A) et TMEM45A^{-/-} (B) exprimant la Cre recombinase ont été incubés sans (CTL) ou en présence de 1 μ M de doxorubicine (D), en normoxie ou en hypoxie pendant 24h. Un test de l'activité caspase-3 a ensuite été réalisé. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles incubées sans doxorubicine en normoxie (N) et représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3).

Test statistique : ANOVA 2. * = significativement différent du contrôle (p<0,05) ; ** = significativement différent du contrôle (p<0,01) ; *** = significativement différent du contrôle (p<0,001) ; #NS = non significativement différent.

présentés à la figure III-11. Tout d'abord, il ressort de ces trois tests que la doxorubicine induit toujours bien la mort des MEFs, quel que soit le génotype de ceux-ci. En ce qui concerne le pourcentage du nombre de cellules vivantes, une diminution de 42%, 53% et 47% respectivement pour les MEFs TMEM45A^{+/+}, TMEM45A^{+/-} et TMEM45A^{-/-} est observée. Au niveau de la cytotoxicité, aucune différence n'apparaît entre les trois lignées de MEFs. Par contre, le résultat du test de l'activité caspase-3 met en évidence une différence assez importante entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et les MEFs TMEM45A^{-/-}. Alors que l'augmentation observée pour les MEFs TMEM45A^{+/+} est de 4,1 fois, celle observée pour les MEFs TMEM45A^{-/-} est de 13,5 fois. Cette différence d'activité caspase-3 entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} suggère que TMEM45A joue un rôle dans la résistance des cellules à l'apoptose induite par la doxorubicine.

Néanmoins, afin de pouvoir confirmer cette observation et cette hypothèse, il est nécessaire de réaliser les différents tests sur d'autres séries de MEFs. Une deuxième série de MEFs n'exprimant pas la Cre recombinase (MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} venant d'embryons d'une même mère) a donc été incubée en présence de 1 µM de doxorubicine pendant 24h et les trois tests ont ensuite été réalisés. La diminution du pourcentage de cellules vivantes est cette fois-ci moins importante pour les MEFs TMEM45A^{-/-} (Figures III-12A et III-12B). En effet, une diminution de 46% est observée pour les MEFs TMEM45A^{+/+} alors qu'elle n'est que de 26% pour les MEFs TMEM45A^{-/-}. Comme pour la première série, l'augmentation de la cytotoxicité observée pour les cellules incubées en présence de 1 µM de doxorubicine en comparaison avec les cellules incubées sans doxorubicine ne diffère pas entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} (Figures III-12C et III-12D). Enfin, l'importante augmentation de l'activité caspase-3 dans les MEFs TMEM45A^{-/-} par rapport aux MEFs TMEM45A^{+/+} n'est plus observée dans cette série de MEFs. En effet, dans ce cas, l'augmentation de l'activité caspase-3 est de 9,9 fois pour les MEFs TMEM45A^{+/+} et de 11,8 fois pour les MEFs TMEM45A^{-/-} (Figures III-12E et III-12F).

Une troisième expérience a été réalisée sur des MEFs exprimant la Cre recombinase. Cela a été réalisé sur trois séries de MEFs différents. Pour une même série, les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} venaient d'embryons d'une même mère. Les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} ont été incubés en présence de 1 µM de doxorubicine pendant 24h. Les différents tests ont ensuite été réalisés. Les diminutions du pourcentage de nombre de cellules vivantes observées pour les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} sont similaires, avec respectivement une diminution de 33% et de 30% (Figures III-13A et III-13B). Les mêmes observations sont faites pour la cytotoxicité, avec des augmentations similaires pour les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} (Figures III-13C et III-13D). En ce qui concerne l'activité caspase-3 (Figures III-13E et III-13F), les MEFs TMEM45A^{+/+} montrent une augmentation légèrement plus importante de l'activité caspase-3 que les MEFs TMEM45A^{-/-}.

En prenant en compte l'ensemble de ces différents résultats, il semble que les MEFs TMEM45A^{-/-} ne sont pas plus sensibles à la mort induite par la doxorubicine que les MEFs TMEM45A^{+/+}.

2.3. Effets de la doxorubicine sur l'apoptose de MEFs incubés en hypoxie

Étant donné que l'effet anti-apoptotique de TMEM45A a été découvert en hypoxie (Flamant et al., 2012), des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase ont été incubés en présence ou non de 1 µM de doxorubicine, en normoxie ou en hypoxie. L'apoptose de ces MEFs a été évaluée par un test de l'activité caspase-3 (Figure III-14). Pour les deux

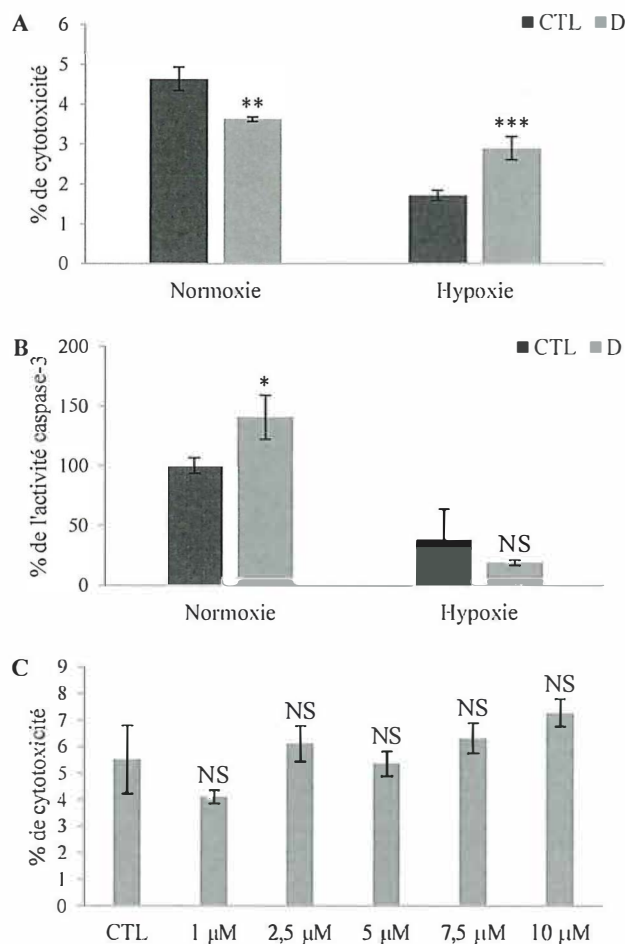


Figure III-15 : Effet de la doxorubicine sur la viabilité de cellules HepG2. (A et B) Des cellules HepG2 ont été incubées sans (CTL) ou en présence de 1 µM de doxorubicine (D) pendant 24h, en normoxie ou en hypoxie. Une mesure du relargage de LDH (A) et un test de l'activité caspase-3 (B) ont ensuite été réalisés. Pour le test de l'activité caspase-3, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées en normoxie sans doxorubicine. Pour les deux tests, les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats. (C) Des cellules HepG2 ont été incubées sans (CTL) ou en présence de différentes concentrations de doxorubicine pendant 24h. Une mesure du relargage de LDH a ensuite été réalisée. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats. Test statistique : ANOVA 2 (A et B) ou ANOVA 1 (C). NS = non significativement différent du contrôle ; * = significativement différent du contrôle ($p < 0,05$).

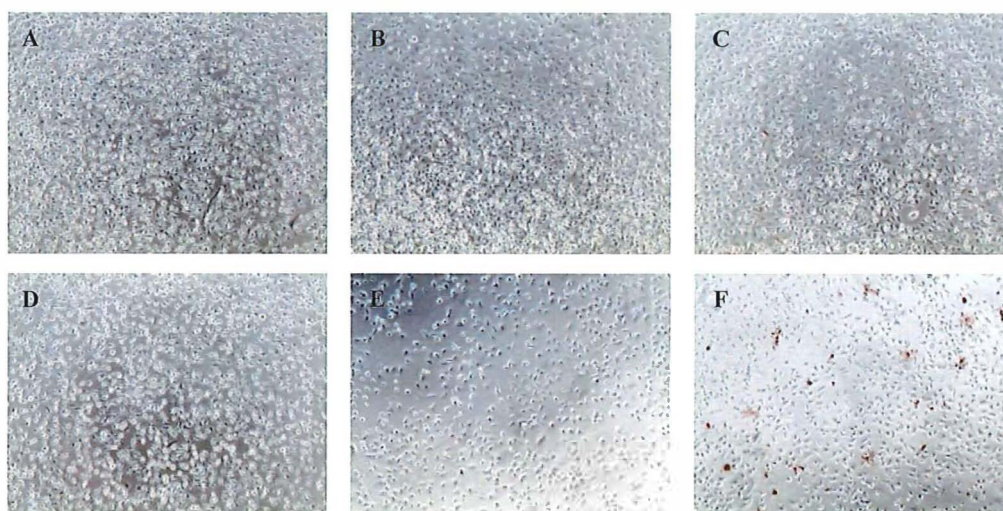


Figure III-16 : Morphologie des cellules MDA-MB-231 après avoir été incubées en présence de doxorubicine. Des cellules MDA-MB-231 ont été incubées sans doxorubicine (A et D) ou en présence de 15 µM (B et E) ou 25 µM (C et F) de doxorubicine. Après l'incubation de 24h (A à C) ou de 48h (D à F), les cellules ont été observées au microscope à contraste de phase.

lignées de MEFs, une augmentation de l'activité caspase-3 dans les MEFs incubés en présence de doxorubicine est observée, que les cellules aient été incubées en normoxie ou en hypoxie. Cette augmentation semble moins importante quand les MEFs ont été incubés en hypoxie mais les différences entre l'augmentation en normoxie et en hypoxie ne sont pas statistiquement significatives. À nouveau, aucune différence entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} n'est observée.

3. Effets de la doxorubicine sur des lignées cancéreuses

L'agent anticancéreux utilisé pour induire la mort des MEFs est la doxorubicine. Cependant, l'effet de TMEM45A sur la résistance induite par l'hypoxie a été démontré pour l'étoposide et le paclitaxel (Flamant et al., 2012), mais pas pour la doxorubicine. Il a donc été nécessaire de vérifier si l'hypoxie induit une résistance contre la mort induite par la doxorubicine et si TMEM45A est impliqué dans ce phénomène. Avant de transfecter les cellules avec un siRNA ciblant TMEM45A, nous avons dû trouver une lignée cancéreuse qui meurt en présence de doxorubicine et qui est protégée de la mort induite par cet agent chimiothérapeutique en hypoxie. En effet, la doxorubicine est souvent décrite pour être cytostatique mais pas toujours cytotoxique.

3.1. Effets de la doxorubicine sur les cellules HepG2

La doxorubicine a tout d'abord été testée sur des cellules de carcinome hépatocellulaire humain, les cellules HepG2. En effet, un phénomène de résistance en hypoxie impliquant TMEM45A est connu pour ces cellules et l'étoposide.

Les cellules HepG2 ont donc été incubées en présence de 1 μ M de doxorubicine, la concentration utilisée dans les expériences réalisées avec les MEFs, en normoxie ou en hypoxie pendant 24h. Après ce temps d'incubation, une mesure du relargage de la LDH et un test de l'activité caspase-3 ont été réalisés. En ce qui concerne la cytotoxicité (Figure III-15A), aucune cytotoxicité n'est observée en normoxie pour les cellules incubées en présence de doxorubicine comparées aux cellules incubées sans doxorubicine, tandis qu'une légère augmentation est détectée en hypoxie. L'activité caspase-3 augmente légèrement quand les cellules sont incubées en normoxie en présence de doxorubicine. En hypoxie, aucune augmentation de l'activité caspase-3 n'est observée (Figure III-15B). Au vu de ces résultats, 1 μ M de doxorubicine ne semble pas suffisant pour induire la mort des cellules HepG2.

Il est possible que la concentration de 1 μ M choisie à partir des expériences réalisées sur les MEFs ne soit pas suffisante pour induire la mort des cellules HepG2. Afin de le vérifier, les cellules HepG2 ont été incubées en présence de concentrations croissantes de doxorubicine pendant 24h et une mesure du relargage de la LDH a été réalisée. À nouveau, aucune augmentation significative de la cytotoxicité n'est observée (Figure III-15C).

Ces différents résultats suggèrent que la doxorubicine n'induit pas la mort des cellules HepG2.

3.2. Effets de la doxorubicine sur les cellules MDA-MB-231

N'ayant pas pu montrer une induction de la mort des HepG2 avec la doxorubicine, nous avons changé de lignée cellulaire cancéreuse. Nous nous sommes tournés vers des cellules de cancer du sein humain, les cellules MDA-MB-231. Un phénomène de résistance en hypoxie impliquant

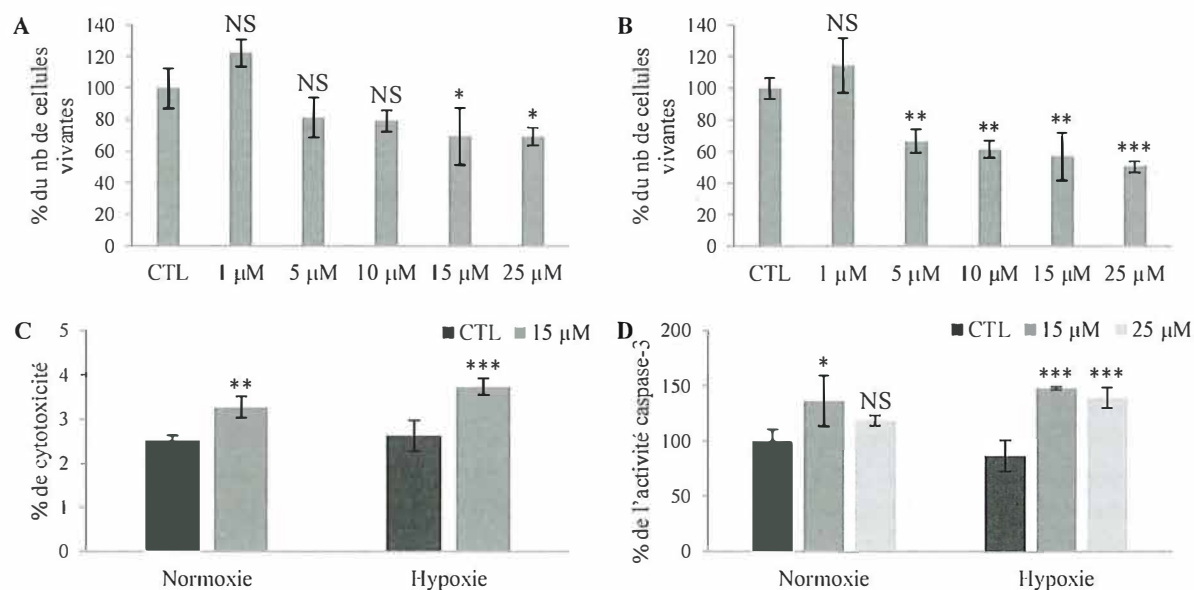


Figure III-17 : Effets de la doxorubicine sur la viabilité de cellules MDA-MB-231. (A et B) Des cellules MDA-MB-231 ont été incubées sans (CTL) ou en présence de différentes concentrations de doxorubicine pendant 24h (A) ou 48h (B). Un test MTT a ensuite été réalisé. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées sans doxorubicine et représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats. (C et D) Des cellules MDA-MB-231 ont été incubées sans (CTL) ou en présence de 15 μ M ou 25 μ M de doxorubicine en normoxie ou en hypoxie pendant 48h. Une mesure du relargage de LDH (C) et un test de l'activité caspase-3 (D) ont ensuite été réalisés. Pour le test de l'activité caspase-3, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées en normoxie sans doxorubicine. Pour les deux tests, les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats.

Test statistique : ANOVA 1 (A et B) ou ANOVA 2 (C et D). non = pas significativement différent du contrôle ; * = significativement différent du contrôle ($p < 0,05$) ; ** = significativement différent du contrôle ($p < 0,01$) ; *** = significativement différent du contrôle ($p < 0,001$).

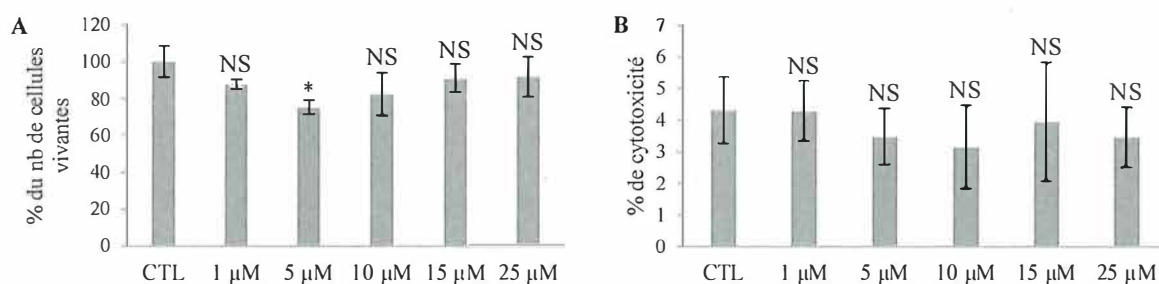


Figure III-18 : Effets de la doxorubicine sur la viabilité de cellules HCT116. (A et B) Des cellules HCT116 ont été incubées sans (CTL) ou en présence de différentes concentrations de doxorubicine pendant 24h. Un test MTT (A) et une mesure du relargage de LDH (B) ont ensuite été réalisés. Pour le test MTT, les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules contrôles (CTL) incubées sans doxorubicine. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type de trois réplicats.

Test statistique : ANOVA 1. NS = non significativement différent du contrôle ; * = significativement différent du contrôle ($p < 0,05$) ; ** = significativement différent du contrôle ($p < 0,01$) ; *** = significativement différent du contrôle ($p < 0,001$).

TMEM45A est en effet connu pour ces cellules incubées en présence de paclitaxel (Flamant et al., 2012).

Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées en présence de différentes concentrations de doxorubicine pendant 24h ou 48h. Avant de réaliser un test MTT, les cellules ont été observées au microscope. La figure III-16 reprend les photos prises pour les deux temps d'incubation, pour les cellules contrôles et les cellules incubées avec les deux concentrations les plus élevées, 15 μ M et 25 μ M. La densité cellulaire observée dans les puits est moins importante lorsque les cellules ont été incubées avec 15 μ M ou 25 μ M de doxorubicine pendant 48h. Ces observations ont été confirmées par les résultats du test MTT. Après 24h d'incubation (Figure III-17A), une diminution de 30% du pourcentage du nombre de cellules vivantes est observée pour les cellules incubées en présence de 25 μ M. Cette diminution est plus importante après 48h d'incubation (Figure III-17B), avec une diminution de 43% pour 15 μ M de doxorubicine et une diminution à 50,81% pour 25 μ M de doxorubicine. De ces résultats, nous avons choisi un temps d'incubation de 48h et les concentrations de 15 μ M et de 25 μ M pour la suite des expériences sur les cellules MDA-MB-231.

Une diminution du pourcentage du nombre de cellules vivantes a donc été montrée sur les cellules MDA-MB-231 incubées en présence de 15 μ M et 25 μ M de doxorubicine pendant 48h. Cependant, le test MTT ne permet pas de dire si cette diminution correspond à la mort des cellules ou si elle correspond à un arrêt de prolifération. Les cellules MDA-MB-231 ont donc été incubées en présence de 15 μ M et 25 μ M en normoxie et en hypoxie. Après 48h d'incubation, une mesure du relargage de la LDH (Figure III-17C) et un test de l'activité caspase-3 (Figure III-17D) ont été réalisés. Pour ces deux tests, une augmentation significative est observée quand les cellules ont été incubées en présence de doxorubicine. Néanmoins, cette augmentation est faible.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent des effets cytostatiques de la doxorubicine sur les cellules MDA-MB-231 puisqu'une diminution du pourcentage de cellules vivantes est observée mais que celle-ci ne correspond pas à une induction de la mort des cellules.

3.3. Effets de la doxorubicine sur les cellules HCT116

Au vu des résultats sur les cellules HepG2 et sur les cellules MDA-MB-231, une troisième lignée cancéreuse a été choisie, des cellules de cancer du colon humain, les cellules HCT116.

Une courbe de concentration a été réalisée sur ces cellules en les incubant en présence de différentes concentrations de doxorubicine pendant 24h. Un test MTT et une mesure du relargage de la LDH ont ensuite été réalisés. Ces deux tests n'ont pas mis en évidence la mort des cellules HCT116. En effet, aucune diminution du pourcentage du nombre de cellules vivantes n'est observée (Figure III-18A). De même, aucune augmentation de la cytotoxicité n'est observée (Figure III-18B).

Comme pour les cellules HepG2 et les cellules MDA-MB-231, la doxorubicine ne semble pas induire la mort des cellules HCT116. Un manque de temps ne nous a permis de poursuivre ces études.

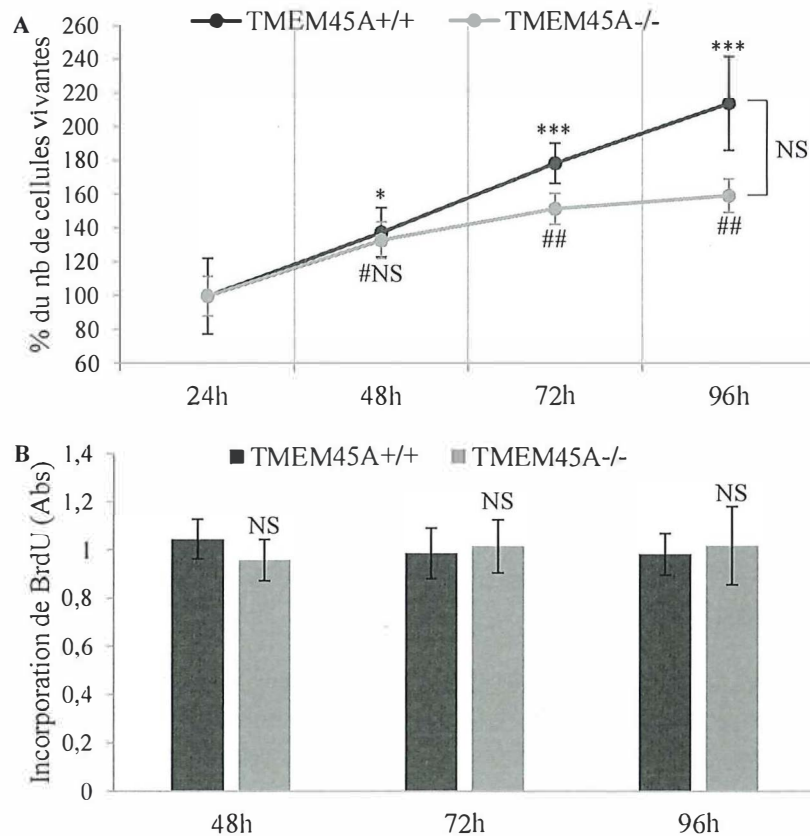


Figure III-19 : Prolifération des MEFs exprimant la Cre recombinase. (A) Des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase ont été repiqués dans des plaques 24-puits. Un test MTT a ensuite été réalisé 24h, 48h, 72h et 96h après le repiquage. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au temps 24h et représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3). (B) Des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} ont été repiqués dans des plaques 96-puits. Après une incubation de 24h avec du BrdU ajouté 24h, 48h et 72h après le repiquage, un test d'incorporation du BrdU a été effectué. Cela a donné des résultats 48h, 72h et 96h après le repiquage. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3).
 Test statistique : ANOVA 2. (A) Pour les MEFs TMEM45A^{+/+} : * = significativement différent du temps 24h (p<0,05) ; *** = significativement différent du temps 24h (p<0,001). Pour les MEFs TMEM45A^{-/-} : #NS = non significativement différent du temps 24h ; ## = significativement différent du temps 24h (p<0,01). NS = pas de différence significative entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}. (B) NS = non significativement différent des MEFs TMEM45A^{+/+}.

4. Prolifération des MEFs

Peu de choses sont connues sur TMEM45A. Nous avons donc décidé d'évaluer la prolifération de MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} afin de voir si TMEM45A joue un rôle dans la prolifération cellulaire. En effet, il a été montré que TMEM45A augmente dans les kératinocytes en différenciation, différenciation qui est parallèle à un arrêt de la prolifération (Flamant et al., 2012).

Pour ce faire, des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase ont été repiqués dans des plaques 24-puits à une densité de 18.000 cellules par puits. Le test MTT permettant d'évaluer le pourcentage du nombre de cellules vivantes, ce test a été réalisé 24h, 48h, 72h et 96h après le repiquage. Les résultats sont présentés à la figure III-19A. Le temps 24h est pris comme référence pour la normalisation ce qui fait que les deux lignées de MEFs se trouvent à 100% du nombre de cellules vivantes pour ce temps. Au temps 48h, aucune différence n'est observable entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}, avec respectivement une augmentation à 138% et 133%. Par contre au temps 72h, une légère différence apparaît dans l'augmentation du pourcentage du nombre de cellules vivantes. Alors que les MEFs TMEM45A^{-/-} augmentent à 152%, les MEFs TMEM45A^{+/+} augmentent à 179%. Cette différence est encore plus marquée au temps 96h, avec une augmentation à 214% pour les MEFs TMEM45A^{+/+} et à 160% pour les MEFs TMEM45A^{-/-}. Cependant, ces différences entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} ne sont pas statistiquement significatives.

Afin d'analyser plus précisément la prolifération, un test d'incorporation du BrdU a été réalisé sur des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase. Ce test évalue l'incorporation du BrdU dans l'ADN nouvellement synthétisé. Cela signifie qu'au plus du BrdU est incorporé, au plus les cellules ont synthétisé de l'ADN et donc au plus elles ont proliféré. Le BrdU a été ajouté au milieu de culture des MEFs 24h, 48h ou 72h après le repiquage pendant 24h ce qui donne des résultats à 48h, 72h ou 96h. Les résultats obtenus pour ce test sont présentés à la figure III-19B. Aucune différence significative n'est observée entre les MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}, et cela pour les différents temps d'incubation testés.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'invalidation de TMEM45A n'affecte pas la prolifération des MEFs en culture.

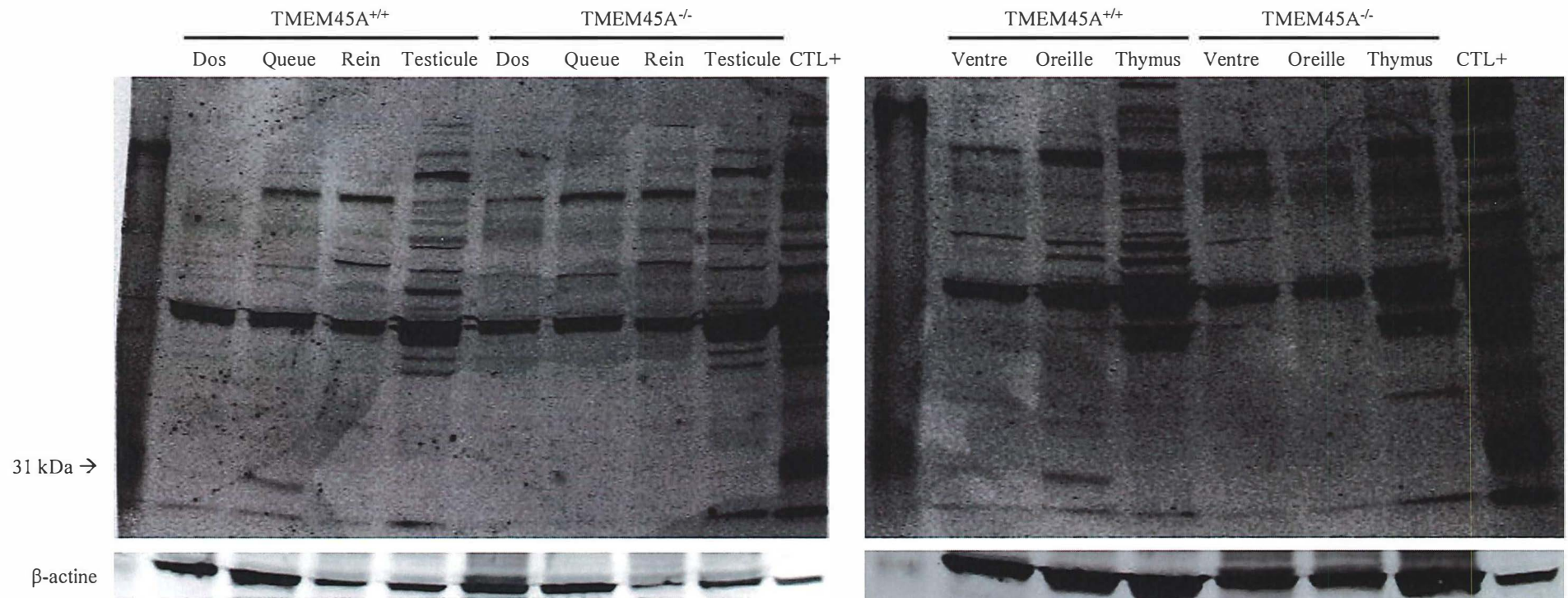


Figure III-20 : Western-blot sur des extraits protéiques de tissus. Différents tissus de souris *TMEM45A*^{+/+} et *TMEM45A*^{-/-} exprimant la Cre recombinase ont été récupérés et les protéines extraites de ceux-ci. Après quoi, un western-blot a été réalisé afin de mettre en évidence TMEM45A. Le contrôle positif correspond à un extrait protéique de cellules transfectées avec un vecteur contenant TMEM45A. Le contrôle de charge de l'expérience est la β -actine. Pour la peau de la queue et la peau de l'oreille, les extractions et les analyses par western-blot ont été réalisées sur trois séries d'échantillons provenant de souris différentes. Ce western-blot est la représentation des trois expériences.

Deuxième partie : Expériences *in vivo*

Différentes informations sont connues sur TMEM45A mais celles-ci restent peu nombreuses. Il a été montré par Hayez et al. que TMEM45A est fortement exprimé dans la peau humaine et y est associé à la kératinisation de l'épiderme (Hayez et al., 2014). Afin d'en savoir plus sur cette protéine et son expression dans les différents tissus, nous avons investigué son expression dans différents organes des souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase.

1. Analyse de l'expression protéique de TMEM45A par western-blot

L'expression tissulaire protéique de TMEM45A a tout d'abord été évaluée sur différents extraits protéiques de tissus de souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} en utilisant la technique de western-blot. Étant donné qu'il est connu que TMEM45A est fortement exprimé dans la peau (Hayez et al., 2014), nous avons prélevé chez les souris un échantillon de peau à différents endroits : sur le dos, sur le ventre, et au niveau de la queue et de l'oreille. Trois autres organes ont également été choisis en s'inspirant des données de *Biogps* : le thymus, le testicule et le rein.

Les résultats du western-blot sont présentés à la figure III-20. Le contrôle positif de cette expérience correspond à un extrait protéique de cellules transfectées avec un vecteur contenant l'ADN_c de TMEM45A. Pour celui-ci, une bande à environ 31 kDa correspondant à TMEM45A est détectée. Des bandes au même poids moléculaire sont retrouvées pour deux échantillons venant de la souris TMEM45A^{+/+}. Ces échantillons correspondent à la peau de la queue et la peau de l'oreille. Ces bandes ne sont pas observées pour les échantillons TMEM45A^{-/-} correspondant. Pour les autres échantillons, aucune bande n'est observée à 31 kDa, aussi bien pour les échantillons de la souris TMEM45A^{+/+} que pour ceux de la souris TMEM45A^{-/-}. Le fait que TMEM45A ne soit pas détecté en western-blot pour ces échantillons n'indique pas nécessairement que TMEM45A n'est pas exprimé dans ces tissus. En effet, TMEM45A peut être exprimé dans ceux-ci mais à un niveau trop faible que pour être détecté ou seulement dans un des types cellulaires présents dans le tissu analysé.

2. Détection de l'activité β -galactosidase dans les tissus

Afin de détecter l'expression et la localisation de TMEM45A dans des coupes de tissus, nous exploitons la présence du gène LacZ dans le vecteur qui a servi à la réalisation de la souris knockout. Ce gène code pour une enzyme, la β -galactosidase. Cette enzyme est responsable du clivage du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Le produit de la réaction forme des précipités bleus à l'endroit où la β -galactosidase est exprimée. De plus, le gène LacZ est sous la dépendance du promoteur endogène du gène de TMEM45A. Donc, lorsque les tissus de souris possédant le vecteur dans leur séquence sont incubés en présence de X-gal, une coloration bleue apparaît là où TMEM45A est normalement exprimé.

2.1. Dans la peau

Avant tout, nous avons commencé par vérifier que nous étions capables de détecter l'activité β -galactosidase par cette technique de coloration en utilisant la peau de souris. En effet, TMEM45A est connu comme étant fortement exprimé dans ce tissu. La peau du dos, du ventre et de la queue de souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} n'exprimant pas la Cre recombinase ont donc été colorées avec le X-gal. Les peaux TMEM45A^{+/+} correspondent aux contrôles négatifs.

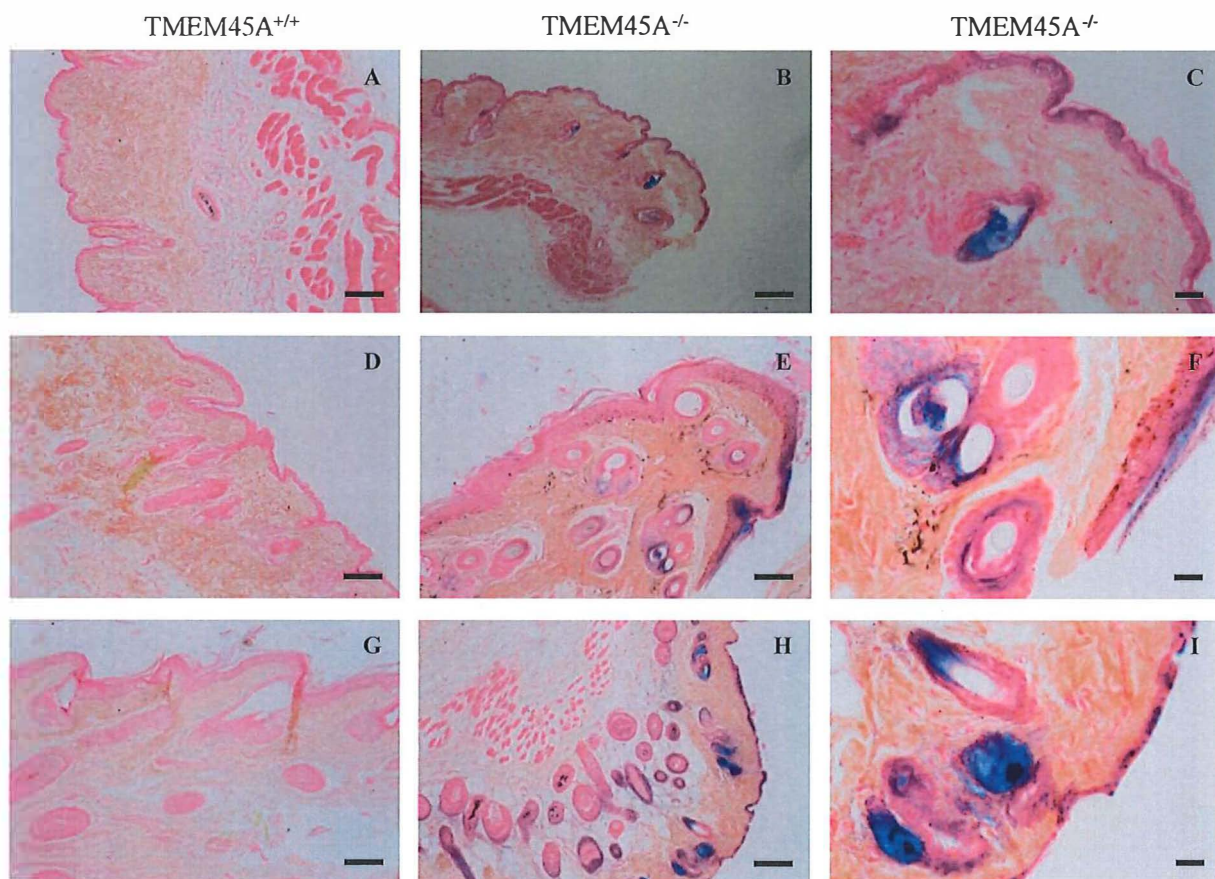


Figure III-21 : Localisation de TMEM45A dans la peau de souris. La peau du dos (A à C), la peau de la queue (D à F) et la peau du ventre (G à I) de souris TMEM45A^{+/+} (A, D et G) et TMEM45A^{-/-} (B, C, E, F, H et I) ont été colorées avec du X-gal afin de détecter l'activité β -galactosidase (coloration bleue). Afin d'observer l'architecture générale des tissus, ceux-ci ont également été colorés à l'éosine (coloration du cytoplasme des cellules) et au safran (coloration des tissus conjonctifs). Barre d'échelle : 100 μ m (A, B, D, E, G et H) ou 20 μ m (C, F et I).

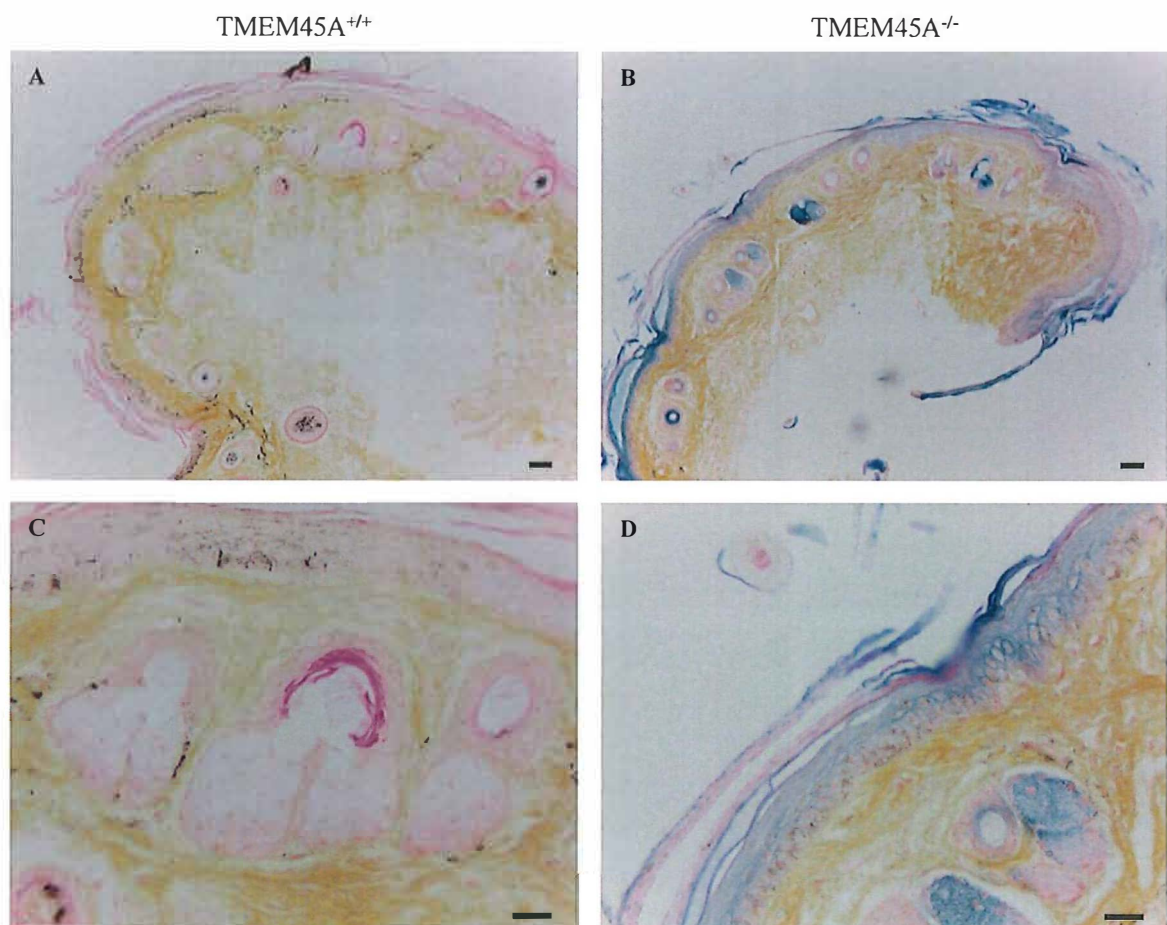


Figure III-22 : Localisation de TMEM45A dans la peau de la queue de souris. La peau de la queue de souris TMEM45A^{+/+} (A et C) et TMEM45A^{-/-} (B et D) a été colorée avec du X-gal afin de détecter l'activité β -galactosidase (coloration bleue). Afin d'observer l'architecture générale des tissus, ceux-ci ont également été colorés à l'éosine (coloration du cytoplasme des cellules) et au safran (coloration des tissus conjonctifs). Barre d'échelle : 50 μ m (A et B) ou 20 μ m (C et D).

En effet, comme le vecteur n'est pas présent dans la séquence du génome des souris TMEM45A^{+/+}, aucune coloration bleue n'est censée apparaître. Si c'est le cas, cela correspond à une coloration aspécifique, qui n'est pas liée à l'expression de TMEM45A.

D'un point de vue histologique, la peau est constituée de trois couches : l'épiderme, la couche la plus externe, le derme, et l'hypoderme, la couche la plus interne. En fonction de la zone du corps, l'épaisseur de ces différentes couches varient. Alors que l'épiderme est plus épais au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds, le derme est plus épais au niveau du dos. L'hypoderme est principalement constitué d'adipocytes. Cette couche permet l'isolation thermique et constitue une réserve énergétique, principalement chez les animaux pour l'hibernation. Le derme constitue la couche la plus solide de la peau, avec principalement du tissu conjonctif. L'épiderme constitue une barrière imperméable, solide et mécaniquement résistante à l'environnement. Il est composé de kératinocytes qui se différencient au fur et à mesure des couches. En effet, plusieurs couches peuvent être déterminées au niveau de l'épiderme : la couche basale, représentant le réservoir de cellules souches, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée, dans laquelle les kératinocytes sont remplis de kératine.

Aucune coloration bleue n'apparaît pour les peaux TMEM45A^{+/+} (Figures III-21A à III-21C). Il n'y a donc pas de coloration bleue aspécifique dans les peaux, ce qui signifie que la coloration bleue observée dans les peaux TMEM45A^{-/-} (Figures III-21D à III-21I) correspond bien à l'expression de TMEM45A. Cette coloration bleue est retrouvée dans les trois types de peau. Elle est observée au niveau de l'épiderme, et de certaines structures présentes dans le derme, la couche se trouvant sous l'épiderme. Ces structures correspondent aux follicules pileux et aux glandes sébacées annexes. Il est à noter que l'expression de TMEM45A dans la peau du dos et du ventre n'avait pas été observée en western-blot mais l'est avec la détection de l'activité β -galactosidase. Cette méthode semble donc plus sensible pour la détection de cellules et tissus exprimant normalement TMEM45A.

Afin de confirmer ces résultats, la coloration a été effectuée sur la peau de la queue d'une souris TMEM45A^{+/+} et d'une souris TMEM45A^{-/-}. À nouveau, aucune coloration bleue n'est observée pour la peau de la queue TMEM45A^{+/+} (Figure III-22A et III-22B), alors qu'elle est observée pour la peau TMEM45A^{-/-} (Figures III-22C et III-22D). Au niveau de l'épiderme, il semble que la coloration est présente dans les kératinocytes des couches supérieures. Cela est cohérent avec le fait que l'expression de TMEM45A augmente avec le processus de kératinisation (Hayez et al., 2014). En effet, au plus on se trouve haut dans l'épiderme, au plus la kératinisation est importante et les kératinocytes différenciés. La coloration est comme précédemment retrouvée au niveau des follicules pileux et des glandes sébacées annexes. Au niveau des follicules pileux, la coloration peut s'expliquer par le fait qu'on y retrouve des structures kératinisées, le poil et la gaine épithéliale interne. De plus, les follicules pileux, ainsi que les glandes sébacées ont été montrés comme pouvant être hypoxiques (Evans et al., 2006).

Pour les autres expériences de détection de l'activité β -galactosidase dans d'autres tissus que la peau, la peau de la queue de souris TMEM45A^{-/-} est utilisée comme contrôle positif, afin de montrer que la coloration a fonctionné.

2.2. Dans le rein

D'un point de vue histologique, le rein peut être divisé en un cortex et en une médullaire, ces deux parties étant elles-mêmes subdivisées. Un néphron correspond à une unité fonctionnelle

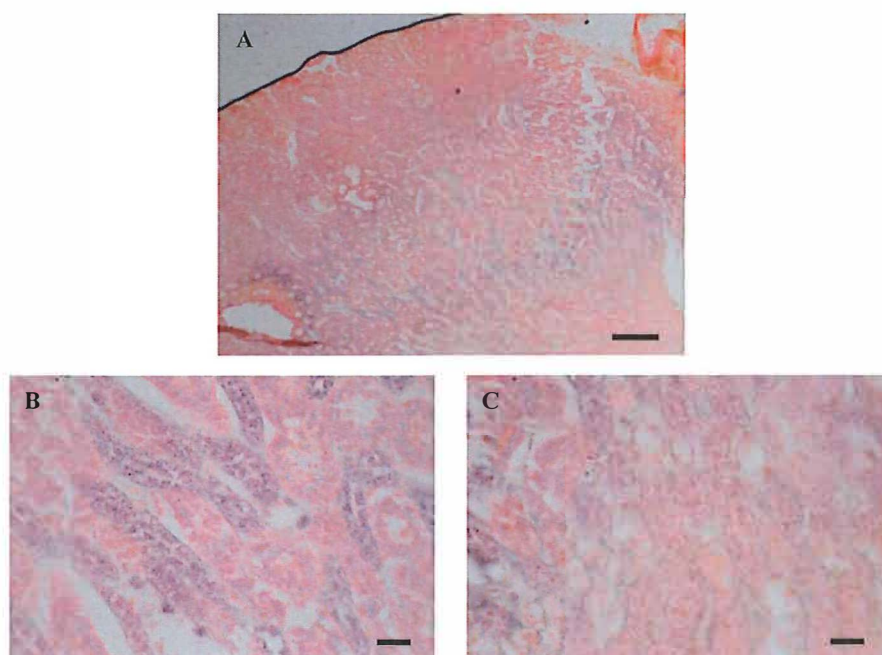


Figure III-23 : Localisation de TMEM45A dans le rein. Le rein d'une souris TMEM45A^{-/-} a été coloré avec du X-gal afin de détecter l'activité β -galactosidase (coloration bleue). Afin d'observer l'architecture générale des tissus, ceux-ci ont également été colorés à l'éosine (coloration du cytoplasme des cellules) et au safran (coloration des tissus conjonctifs). Barre d'échelle : 50 μ m (A) ou 20 μ m (B et C).

du rein. Il est constitué d'une zone de filtration, le corpuscule de Malpighi qui est communément appelé glomérule, et du tube urinaire, composé de plusieurs segments. Le corpuscule de Malpighi est composé d'une partie artérielle, le glomérule, et d'une partie urinaire, la capsule de Bowman qui est constituée de cellules épithéliales pavimenteuses au niveau de son feuillet externe et de podocytes au niveau de son feuillet interne. La membrane d'ultrafiltration est le nom donné à la capsule de Bowman quand elle est en contact avec les capillaires sanguins fenestrés des glomérules. Dans le cortex rénal, les tubes urinaires sont contournés et dans la médullaire, au niveau des pyramides de Malpighi, ils sont droits.

L'activité β -galactosidase a été évaluée dans le rein de souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}. Les reins ont été coupés longitudinalement une fois prélevés des souris. Cependant, quelques problèmes techniques se sont présentés. En effet, une zone plus bleue était observée sur le rein TMEM45A^{-/-} après coloration mais nous n'observions pas cette coloration bleue sur les coupes. Cette zone semblait se trouver au niveau de la médullaire externe du rein. Lorsque nous avons eu des photos de rein TMEM45A^{-/-} avec une coloration bleue (Figures III-23), nous n'avions pas le contrôle négatif avec un rein TMEM45A^{+/+} car la souris que nous pensions être TMEM45A^{+/+} était en fait une souris TMEM45A^{-/-}, avec donc également une coloration bleue au vu de la présence du vecteur. Cette coloration est observée au niveau des tubules rénaux. Le problème est que lorsque nous avons eu le contrôle négatif avec un rein provenant d'une souris TMEM45A^{+/+}, une coloration bleue a également été observée sur celui-ci, tout comme sur le rein provenant d'une souris TMEM45A^{-/-}. La coloration bleue observée au niveau des reins semble donc ne pas correspondre à l'expression de TMEM45A. Dans une étude s'intéressant à l'activité endogène de la β -galactosidase, il a été montré une coloration bleue modérée correspondant à une activité β -galactosidase endogène au niveau de reins de souris (Bolon, 2008). De plus, la détection de cette activité endogène de la β -galactosidase dépend du pH de la solution de coloration (Weiss et al., 1999). L'analyse de l'expression de TMEM45A dans le rein avec la détection de l'activité β -galactosidase ne semble donc pas adéquate. Il pourrait être intéressant de réaliser un immunomarquage avec l'anticorps reconnaissant spécifiquement TMEM45A sur des coupes de rein afin de voir si TMEM45A est exprimé ou non dans le rein.

3. Évaluation de la fonction rénale

Comme nous avons observé une coloration bleue dans le rein TMEM45A^{-/-} quand nous n'avions pas encore de contrôle négatif adéquat, nous avons décidé d'évaluer la fonction rénale de souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} pensant que TMEM45A était exprimé dans le rein. Pour cela, les souris ont été placées en cage métabolique pendant 24h et leur urine récupérée.

Le rein a de nombreuses fonctions, dont celle d'assurer l'homéostasie hydroélectrique. Au niveau des glomérules rénaux, le sang est filtré de manière aspécifique. Le filtrat ainsi formé traverse ensuite les tubes du néphron, l'unité fonctionnelle du rein. C'est à ce niveau que des processus de réabsorption (du filtrat vers le sang) et de sécrétion (du sang vers le filtrat) ont lieu. Certains éléments sont uniquement filtrés, comme la créatinine. La créatinine correspond au produit de déshydratation de la créatine phosphate, une réserve d'énergie des muscles, qui passe dans le sang et est totalement éliminée par le rein. Cet élément est très utile pour évaluer la fonction glomérulaire, et donc la fonction rénale. En effet, la créatinine est totalement éliminée dans les urines et est produite de manière constante chez un même individu. Par contre, le glucose est filtré et totalement réabsorbé. Les taux de glucose retrouvés dans les urines sont donc faibles. Si ce n'est pas le cas, cela indique une atteinte tubulaire.

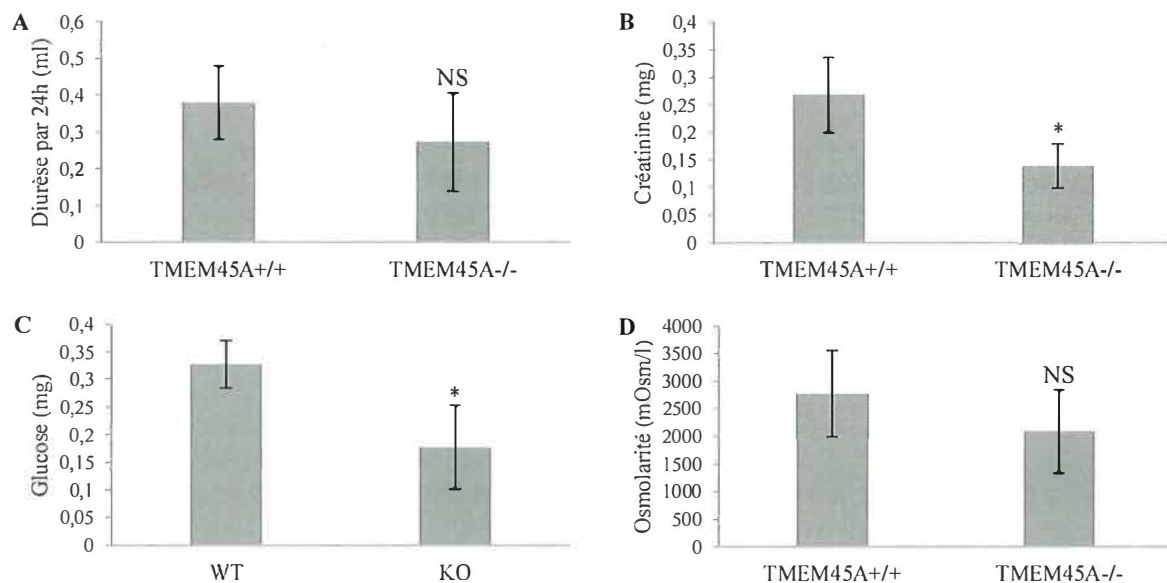


Figure III-24 : Analyses urinaires. Trois souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} exprimant la Cre recombinase ont été mises en cage métabolique pendant 24h et l'urine a été récupérée. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ 1 écart-type (n=3). (A) Diurèse des souris. (B) Dosage de la créatinine. (C) Dosage du glucose. (D) Osmolarité.

Test statistique : Test de Student. NS = non significativement différent des souris TMEM45A^{+/+} ; * = significativement différent des souris TMEM45A^{+/+} (p<0,05).

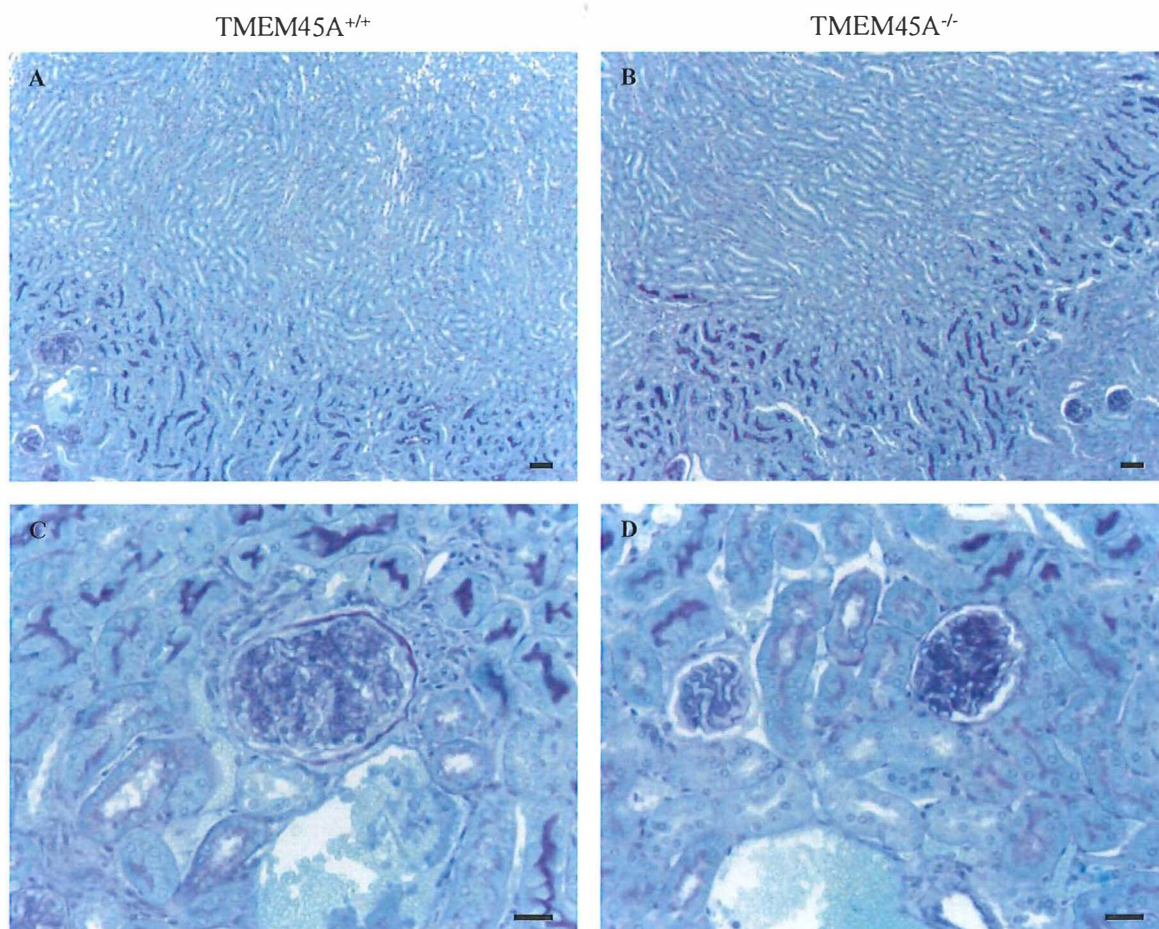


Figure III-25 : Coloration P.A.S. des reins. Les reins de souris TMEM45A^{+/+} (A et C) et TMEM45A^{-/-} (B et D) ont été colorés avec le réactif de Schiff mettant en évidence les sucres. Afin d'observer l'architecture générale des tissus, ceux-ci ont également été colorés à l'hémalum (coloration des noyaux des cellules) et au bleu de Luxol (coloration du cytoplasme). Barre d'échelle : 50 μ m (A et B) ou 20 μ m (C et D).

Différentes analyses sur l'urine de souris permettent une évaluation de la fonction rénale. Tout d'abord, la diurèse (débit urinaire) donne déjà des indications sur la fonction rénale. Comme le montre la figure III-24A, il n'y a pas de différence au niveau de la diurèse entre les souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}. Le dosage de la créatinine a été réalisé afin d'évaluer la fonction rénale. Les souris TMEM45A^{+/+} semblent avoir une meilleure fonction rénale que les souris TMEM45A^{-/-} comme celles-ci présentent une plus faible quantité de créatinine dans leur urine (Figure III-24B). Ensuite, le dosage du glucose urinaire a été réalisé. La quantité de glucose retrouvée dans l'urine des souris TMEM45A^{-/-} est légèrement plus faible que celle retrouvée dans l'urine des souris TMEM45A^{+/+} (Figure III-24C). Cette légère différence est statistiquement significative. Enfin, l'osmolarité des différents échantillons d'urine a été déterminée, permettant d'évaluer la capacité de concentration des urines par le rein. Aucune différence n'apparaît entre les échantillons d'urines des souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} (Figure III-24D).

Le rein peut aussi être analysé histologiquement par la coloration P.A.S. mettant en évidence en rouge les polysaccharides au sens large, comme les glycoprotéines ou le glycogène. Dans le rein, de telles molécules sont retrouvées au niveau des lames basales de la capsule de Bowman (glomérules) et des tubes urinaires, et au niveau de la bordure en brosse des segments proximaux de ces derniers. Les lames basales sont retrouvées à différents endroits dans les tissus, notamment sous les épithéliums. Elles constituent un soutien mécanique ainsi qu'une barrière. De plus, au niveau des glomérules rénaux, les lames basales ont une fonction de filtration. Elles sont composées de différents éléments, dont le perlécane et l'entactine qui sont responsables de la coloration P.A.S. positives. Les bordures en brosse sont constituées des microvillosités dont les membranes sont riches en glycoprotéines ce qui explique la coloration P.A.S. positive. Il ne semble pas y avoir de différence entre le rein TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} (Figure III-25). En effet, aussi bien au niveau des glomérules qu'au niveau des tubes proximaux, la coloration rouge semble identique.

Pris ensemble, ces différents résultats suggèrent qu'il est possible que l'absence de TMEM45A entraîne un défaut de la fonction de filtration rénale sans qu'il n'y ait de lésions histologiques marquées au niveau des reins.

IV. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GENERALE

Première partie : Discussion et perspectives des résultats *in vitro*

Dans le combat contre le cancer, l'apparition de résistance des cellules cancéreuses aux traitements est un réel problème. En effet, avec l'apparition de résistance, le succès des traitements est mis à mal. Ces mécanismes de résistance sont multiples et une même cellule cancéreuse est souvent résistante à plus d'un agent chimiothérapeutique. L'hypoxie a été montrée comme participant à l'apparition de ces phénomènes de résistance (Rebucci and Michiels, 2013). En effet, alors que des cellules cancéreuses incubées en normoxie en présence d'un agent chimiothérapeutique meurent par apoptose, des niveaux de mort par apoptose plus faibles sont observés pour les mêmes cellules incubées en hypoxie avec le même agent chimiothérapeutique. En étudiant l'expression des gènes en hypoxie et en présence d'agents chimiothérapeutiques, il a été découvert que TMEM45A, une protéine transmembranaire dont le rôle est encore inconnu, est surexprimé dans ces conditions. En invalidant l'expression de cette protéine par l'utilisation de siRNA, il a été montré que la résistance observée en hypoxie des cellules MDA-MB-231 et HepG2 à la mort induite par le paclitaxel ou l'étoposide respectivement est supprimée. Ces résultats ont donc suggéré un rôle de TMEM45A dans la résistance à la mort induite par des agents chimiothérapeutiques. Le premier objectif de ce travail est d'étudier le rôle de TMEM45A dans la résistance à la mort induite par des agents chimiothérapeutiques. Pour cela, des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) déficients pour TMEM45A ou non ont été utilisés.

Avant tout, nous avons étudié l'expression de TMEM45A dans les MEFs. Différentes expériences ont été réalisées avec des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}. Nous avons tout d'abord montré une importante diminution de l'expression en ARN_m de TMEM45A dans les MEFs TMEM45A^{-/-} par rapport aux MEFs TMEM45A^{+/+}, que ces cellules expriment ou non la Cre recombinase. Par contre, nous n'avons pas été capables de détecter l'expression protéique de ces MEFs, sans doute dû à une trop faible expression de cette protéine. L'expression en ARN_m de TMEM45A a également été étudiée dans des MEFs TMEM45A^{+/+} incubés en hypoxie, étant donné que TMEM45A est connu pour être un gène cible de HIF-1 (Benita et al., 2009). Une forte augmentation de l'expression en ARN_m de TMEM45A est observée dans ces conditions. De plus, l'expression protéique de TMEM45A a pu être détectée par un immunomarquage lorsque des MEFs TMEM45A^{+/+} ont été incubés en hypoxie. À noter que cette expression protéique de TMEM45A n'a pas été retrouvée dans des MEFs TMEM45A^{-/-} incubés en hypoxie.

La localisation de TMEM45A dans les MEFs TMEM45A^{+/+} incubés en hypoxie a été observée dans la zone périnucléaire, une zone connue pour être également la localisation de l'appareil de Golgi. Cela nous a donc mené à réaliser un co-marquage pour TMEM45A et GM130, une protéine de matrice du réseau cis-golgien. Bien qu'aucune co-localisation stricte entre ces deux protéines n'ait été observée, ces deux protéines ont été observées proches l'une de l'autre, comme s'entremêlant l'une l'autre. Ces résultats suggèrent donc une localisation de TMEM45A au niveau de l'appareil de Golgi, ce qui est cohérent avec les résultats de Hayez et al. obtenus sur des kératinocytes (Hayez et al., 2014). Il serait intéressant de confirmer cette localisation de TMEM45A au niveau de l'appareil de Golgi dans les MEFs en réalisant d'autres co-marquages avec d'autres protéines de l'appareil de Golgi, comme la golgin-97, une protéine du réseau trans-golgien. En effet, Hayez et al. ont montré une co-localisation entre cette protéine et TMEM45A (Hayez et al., 2014).

Afin d'induire la mort des MEFs, nous avons tout d'abord testé l'étoposide. Cependant, la diminution du nombre de cellules vivantes observée pour la plus haute concentration

d'étoposide testée ne nous a pas semblé suffisante pour la suite des expériences. Ces résultats sont cohérents avec des résultats provenant de la littérature. En effet, Shimazaki et al. ont montré une faible diminution du pourcentage de cellules vivantes quand des MEFs sauvage étaient incubés en présence de 30 μ M d'étoposide pour 48h. Néanmoins, ils ont continué d'utiliser l'étoposide pour induire la mort des MEFs mutants pour leur protéine d'intérêt (Pin1). Une diminution plus importante du pourcentage de cellules vivantes était observée pour ces MEFs mutants (Shimazaki et al., 2012). Dans ce travail, l'étoposide a seulement été testé sur des MEFs TMEM45A^{+/+}. Il pourrait donc être intéressant de tester l'effet de l'étoposide sur des MEFs TMEM45A^{-/-}. En effet, TMEM45A n'étant pas exprimé dans ce type de MEFs et étant impliqué dans un phénomène de résistance à la mort induite par l'étoposide, une diminution du nombre de cellules vivantes et une augmentation de la mort pourraient être observées pour ces MEFs. De plus, le temps d'incubation maximum testé était de 24h. Il pourrait également être intéressant de tester des temps plus longs d'incubation des MEFs en présence d'étoposide, comme 48h d'incubation.

Étant donné que nous n'avons pas observé d'effets suffisants de l'étoposide sur les MEFs, nous nous sommes tournés vers la doxorubicine pour induire la mort des MEFs, en nous basant sur des résultats de la littérature. Cependant, l'implication de TMEM45A dans un phénomène de résistance de cellules cancéreuses à la mort induite par cet agent chimiothérapeutique n'a pas été montrée. Afin de vérifier une éventuelle implication de TMEM45A dans un phénomène de résistance à la doxorubicine, trois lignées cellulaires cancéreuses (HepG2, MDA-MB-231, HCT116) ont été incubées en présence de doxorubicine. Les résultats obtenus pour ces trois lignées cellulaires suggèrent que la doxorubicine n'induit pas la mort de ces cellules cancéreuses. Nous n'avons donc pas été capables de montrer une implication de TMEM45A dans un phénomène de résistance à la doxorubicine.

L'effet de la doxorubicine sur des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} semble être identique. En effet, aucune différence dans le pourcentage de cellules vivantes et dans la cytotoxicité n'a été observée lors des différentes expériences réalisées. En ce qui concerne l'augmentation de l'activité caspase-3, une augmentation plus importante de l'activité caspase-3 a été observée pour les MEFs TMEM45A^{-/-} de la première série de MEFs utilisée. Cependant, cette augmentation plus importante n'a pas été retrouvée lors des mêmes expériences sur d'autres séries de MEFs. Pris ensemble, ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas une plus importante augmentation de l'activité caspase-3 pour les MEFs TMEM45A^{-/-} comparés aux MEFs TMEM45A^{+/+}. De plus, aucune différence n'est apparue dans le pourcentage d'activité caspase-3 entre des MEFs incubés en normoxie et en hypoxie. L'absence de TMEM45A n'a donc pas d'impact sur la mort des MEFs induite par la doxorubicine, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie.

En prenant en compte les résultats obtenus avec les cellules cancéreuses et ceux obtenus avec les MEFs, il est difficile de tirer une conclusion. Les résultats obtenus avec les MEFs suggèrent que TMEM45A n'est pas impliqué dans un phénomène de résistance à la mort induite par la doxorubicine. Cependant, l'implication de TMEM45A dans un phénomène de résistance à la mort induite par la doxorubicine dans des cellules cancéreuses n'a pas été montrée.

Afin de pouvoir interpréter correctement les résultats obtenus avec les MEFs, il est cependant nécessaire de trouver une lignée cancéreuse qui meurt en présence de doxorubicine afin de vérifier si un phénomène de résistance apparaît en hypoxie et si TMEM45A est impliqué dans celui-ci. Pour cela, il pourrait être intéressant de se tourner vers les lignées cellulaires d'adénocarcinome de poumon humain SPCA1 et A549. En effet, il a été montré que ces cellules deviennent résistantes à la doxorubicine et à la cisplatine quand elles sont incubées en hypoxie (Song et al., 2006). Les effets de la doxorubicine en hypoxie dépendent des lignées cancéreuses.

En effet, il a été montré que l'activité d'HIF-1 α est inhibée dans des cellules cancéreuses ovariennes humaines incubées en hypoxie en présence de doxorubicine (Duyndam et al., 2007). De plus, des cellules de sarcome murin (Sarcoma 180) et de carcinome mammaire murin (EMT6) ont été montrées comme plus sensibles à la doxorubicine quand elles étaient incubées en hypoxie (Kennedy et al., 1983). Cela a également été montré pour d'autres types cellulaires, dont les cellules de cancer du sein humain MCF-7 (Strese et al., 2013). Cette dernière étude précise qu'en fonction de la méthode choisie pour analyser l'effet d'agents chimiothérapeutiques sur des cellules hypoxiques, les résultats peuvent être différents. De plus, l'état de confluence des cellules a un impact sur l'effet de la doxorubicine. Il a été montré pour des cellules MDA-MB-231 incubées en présence de doxorubicine une résistance à la mort induite par celle-ci quand les cellules étaient fortement confluentes. Il a également été trouvé que l'expression de HIF-1 augmente avec l'état de confluence des cellules (Fang et al., 2007), comme l'expression de TMEM45A (Hayez et al., 2014).

Dans des cellules de gliome humain, la résistance à la doxorubicine, ainsi qu'à l'étoposide, en hypoxie semble notamment passer par HIF-1 et MRP-1 (Chen et al., 2009). D'autres transporteurs sont impliqués dans le phénomène de résistance à la doxorubicine, comme la P-glycoprotéine (Thorn et al., 2011). De plus, la doxorubicine ayant notamment comme fonction d'inhiber la topoisomérase-2, il a été montré que la diminution d'expression de cette enzyme entraîne un phénomène de résistance à la doxorubicine (Burgess et al., 2008).

Les MEFs et les cellules cancéreuses sont des cellules différentes et difficilement comparables. En effet, les cellules cancéreuses sont des cellules transformées avec un grand nombre de voies métaboliques dérégulées ce qui n'est pas le cas des MEFs qui sont des cellules normales. Hanahan et Weinberg ont listé les principales caractéristiques des cellules cancéreuses : l'échappement aux suppresseurs de croissance, à la destruction immune, l'immortalité répliquative, la promotion de l'inflammation, l'invasion et métastase, l'induction de l'angiogenèse, l'instabilité génomique, la résistance à la mort cellulaire, la dérégulation des voies énergétiques cellulaires, le maintien des signaux de prolifération (Hanahan and Weinberg, 2011).

Une étude s'est intéressée à l'apoptose induite par la doxorubicine dans des cellules normales et cancéreuses. Cette étude a montré que les mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par la doxorubicine sont différents dans les cellules normales et cancéreuses. En effet, l'apoptose des cellules normales induite par la doxorubicine passe par un mécanisme médié par l'H₂O₂ et indépendamment de p53 alors que ce dernier est fortement impliqué dans l'apoptose des cellules cancéreuses induite par la doxorubicine (Wang et al., 2004).

Une autre étude s'est intéressée à l'effet de la doxorubicine sur la sous-unité AMPK α 2 de la protéine kinase AMPK (AMP-activated protein kinase) dans des MEFs ou des cellules cancéreuses. Cette protéine kinase a été décrite comme régulant l'homéostasie énergétique cellulaire mais également l'apoptose. Il a été montré que la doxorubicine induit l'expression de AMPK α 2 dans les MEFs ce qui n'est pas le cas dans les cellules cancéreuses (Yang et al., 2014). Ces résultats de la littérature suggèrent donc que les voies enclenchées par la doxorubicine dans des cellules normales et des cellules cancéreuses sont différentes.

Néanmoins, des approches similaires utilisant des MEFs déficients pour une protéine impliquée dans un phénomène de résistance existent dans la littérature, faisant de ce modèle, un modèle couramment utilisé. Par exemple, une étude s'intéressant à la P-glycoprotéine et à MRP1 dans la sensibilité à des agents chimiothérapeutiques a utilisé des MEFs déficients pour ces protéines (Lin et al., 2002). Une autre étude a démontré l'implication de HIF-1 α dans la résistance à l'étoposide en utilisant des MEFs déficients pour cette sous-unité de HIF-1. Cette étude a permis de mettre en évidence un lien entre HIF-1 α et des protéines de réparation de l'ADN (Wirthner et al., 2008). TMEM45A étant un gène cible de HIF-1, il pourrait être intéressant

d'utiliser ce modèle de MEFs déficients pour HIF-1 α pour étudier le mécanisme de résistance impliquant TMEM45A.

Il a été montré que les effets de l'épirubicine sur les cellules MDA-MB-231 sont les mêmes que ces cellules aient été incubées en normoxie ou en hypoxie (Flamant et al., 2012). TMEM45A ne semble donc pas impliquer dans un phénomène de résistance à l'épirubicine. L'épirubicine est un épimère de la doxorubicine. Leur structure ne diffère que par la configuration d'un seul groupement -OH. Il est donc possible que TMEM45A ne soit pas impliqué dans un phénomène de résistance à la doxorubicine.

Le fait que la localisation de TMEM45A ait été observée au niveau de l'appareil de Golgi peut amener différentes explications quant au rôle de TMEM45A dans un phénomène de résistance. En effet, il existe plusieurs exemples dans la littérature où la séquestration de drogues au niveau de l'appareil de Golgi via des protéines se trouvant à son niveau participe à des phénomènes de résistance. C'est notamment le cas de la protéine ATP7A qui permet la séquestration d'agents chimiothérapeutiques au niveau de l'appareil de Golgi (Owatari et al., 2007). De plus, cette protéine change de localisation cellulaire en fonction de la sensibilité des cellules. Alors qu'on la retrouve au niveau du réseau trans-golgien dans des cellules sensibles à la cisplatine, cette protéine est retrouvée plus en périphérie dans les cellules résistantes à la cisplatine (Kalayda et al., 2008).

TMEM205, une autre protéine transmembranaire, est également associé à un phénomène de résistance à la cisplatine. La cisplatine se retrouve principalement dans des vésicules cytosoliques dans les lignées cellulaires résistantes alors qu'elle est retrouvée au niveau du noyau dans les lignées cellulaires sensibles (Shen et al., 2010). Dans ces cellules résistantes à la cisplatine, TMEM205 est retrouvé au niveau de la région du réseau trans-golgien, près du noyau. Par des co-marquages, il a été montré que TMEM205 co-localise avec Rab8 qui est impliqué dans le recyclage endosomal. De plus, la localisation des vésicules où s'accumulent la cisplatine et celle de TMEM205 et Rab8 sont similaires. De ces différents résultats, il a été suggéré que TMEM205 pourrait séquestrer la cisplatine dans des vésicules et que Rab8 permettrait le trafic de celles-ci et leur exocytose (Shen and Gottesman, 2012). Un mécanisme similaire pourrait expliquer les phénomènes de résistance en rapport avec TMEM45A. Il pourrait donc être intéressant de regarder la répartition des différentes drogues dans les cellules résistantes et de voir si elles s'accumulent dans des vésicules. De plus, réaliser des co-marquages entre TMEM45A et des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire pourrait également être envisagé.

La doxorubicine est une molécule classée dans les bases faibles lipophiles avec un pK se trouvant entre 7 et 9. Cela a pour conséquence que la doxorubicine est non chargée au pH intracellulaire normal et donc qu'elle peut diffuser librement au travers des membranes des organites et vésicules. Le pH de ces éléments cellulaires est souvent plus acide que le pH cytoplasmique. Une fois dans ces éléments, la doxorubicine se charge et n'est donc plus capable de diffuser au travers des membranes pour ressortir dans le cytoplasme. Donc, la doxorubicine s'accumule dans les organites (Larsen et al., 2000). Tenant compte de cela, la doxorubicine ne semble pas avoir besoin d'un transporteur pour s'accumuler dans les organites, dont l'appareil de Golgi. Cela pourrait donc expliquer pourquoi aucun effet de l'inactivation de TMEM45A n'est observé quand les MEFs sont incubés présence de cet agent chimiothérapeutique.

De plus, il a été montré que la distribution cellulaire des anthracyclines, donc de la doxorubicine, varie en fonction du fait que les cellules soient sensibles ou résistantes à ces agents chimiothérapeutiques. Quelques minutes après l'application de la doxorubicine, celle-ci

se retrouve dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules sensibles. Cependant, dans les cellules résistantes, la doxorubicine est principalement distribuée à la périphérie cellulaire (Coley et al., 1993).

D'autres molécules pourraient être testées sur les MEFs afin d'induire leur mort et par la suite d'investiguer la sensibilité des MEFs TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}. Par exemple, le paclitaxel pourrait être utilisé sur les MEFs. En effet, il a été montré que TMEM45A est impliqué dans un phénomène de résistance à cette molécule quand des cellules MDA-MB-231 ont été incubées en hypoxie (Flamant et al., 2012).

Deuxième partie : Discussion et perspectives des résultats *in vivo*

Les informations concernant TMEM45A sont peu nombreuses. À côté de l'observation que TMEM45A est surexprimé dans certaines cellules cancéreuses en hypoxie et y participe à la résistance à certains agents chimiothérapeutiques, il a été montré que TMEM45A est fortement exprimé dans la peau, principalement dans les couches supérieures de l'épiderme kératinisé. De plus, l'expression de TMEM45A augmente avec la différenciation des kératinocytes (Hayez et al., 2014).

Les résultats des analyses par western-blot réalisées sur différents tissus de souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-} confirment l'expression de TMEM45A dans la peau de souris. Par contre, aucun signal correspondant à TMEM45A n'a été observé pour le testicule, le thymus et le rein.

Afin de localiser TMEM45A dans les tissus, l'activité β -galactosidase associée à l'expression de TMEM45A quand le vecteur est présent dans la séquence du génome des souris a été détectée. L'activité β -galactosidase est retrouvée dans la peau de souris TMEM45A^{-/-}, notamment au niveau des couches supérieures de l'épiderme. Ces résultats sont cohérents avec la localisation de TMEM45A dans la peau humaine de Hayez et al. De plus, l'activité β -galactosidase est également retrouvée au niveau de certaines structures du derme, les follicules pileux et les glandes sébacées. Ces structures sont connues pour être hypoxiques (Evans et al., 2006), expliquant le fait que TMEM45A puisse y être exprimé. Il a également été montré que l'épiderme est une région de faible pression partielle en oxygène, et donc hypoxique (Evans et al., 2006). Cela pourrait expliquer l'expression de TMEM45A dans cette couche. Cependant, l'expression de HIF-1 α est plutôt retrouvée dans les couches basales (Rezvani et al., 2011) alors que celle de TMEM45A est plutôt retrouvée dans les couches supérieures.

L'expression de TMEM45A a également été étudiée dans le rein. Cependant, les résultats obtenus ne sont encore que préliminaires et il est difficile de dire si oui ou non cette protéine y est exprimée. L'étude de l'expression de TMEM45A doit être approfondie, notamment par un immunomarquage.

Néanmoins, des tests fonctionnels du rein ont déjà été réalisés sur des échantillons d'urine de souris TMEM45A^{+/+} et TMEM45A^{-/-}. Alors qu'aucune différence n'a été observée pour la diurèse et l'osmolarité, une diminution de la quantité de créatinine et de la quantité de glucose a été observée pour les souris TMEM45A^{-/-}. La créatinine constitue un bon indicateur de la fonction de filtration du rein, puisque cette molécule est seulement sécrétée et que ses niveaux varient peu pour un même individu. Une diminution de la quantité de créatinine dans les urines indique un problème de filtration rénale. Cependant, afin de normaliser les valeurs, il serait

intéressant de comparer les valeurs de créatinine urinaires et plasmatiques. De plus, le fait d'être placée en cage métabolique est un élément stressant pour les souris pouvant influencer la diurèse. Il pourrait être intéressant d'habituer les souris aux cages métaboliques avant de récolter l'urine pour les expériences. Ces expériences sont donc à confirmer et à approfondir. Une approche intéressante à envisager est d'amener un stress rénal (acidose, stress hydrique) afin d'évaluer une éventuelle différence.

Conclusion générale

En conclusion à ce travail, les différentes expériences réalisées sur les MEFs ne nous ont pas permis de mettre en évidence une sensibilité plus importante des MEFs TMEM45A^{-/-} comparés aux MEFs TMEM45A^{+/+} à la mort induite par la doxorubicine. Nous ne pouvons cependant pas exclure l'implication de TMEM45A dans un phénomène de résistance puisqu'une implication de TMEM45A dans la résistance à la mort induite par la doxorubicine en hypoxie n'a pas été montrée dans des cellules cancéreuses. Les résultats obtenus *in vivo* ont quant à eux permis de confirmer l'expression de TMEM45A dans la peau. En ce qui concerne l'expression de TMEM45A dans d'autres tissus, les résultats obtenus pour le rein restent à être confirmés. Il faudra également investiguer l'expression et la fonction de TMEM45A dans d'autres tissus.

Pour clôturer ce mémoire, je voudrais citer une phrase de Darwin qui, au vu de l'adaptabilité des cellules cancéreuses à survivre, est selon moi à propos : *"It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives. It is the one that is the most adaptable to change"*.

V. REFERENCES

Bibliographie

- ASHE, P. C. & BERRY, M. D. 2003. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27, 199-214.
- BENITA, Y., KIKUCHI, H., SMITH, A. D., ZHANG, M. Q., CHUNG, D. C. & XAVIER, R. J. 2009. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res*, 37, 4587-602.
- BERTOUT, J. A., PATEL, S. A. & SIMON, M. C. 2008. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 967-75.
- BIEGING, K. T., MELLO, S. S. & ATTARDI, L. D. 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14, 359-70.
- BOLON, B. 2008. Whole mount enzyme histochemistry as a rapid screen at necropsy for expression of beta-galactosidase (LacZ)-bearing transgenes: considerations for separating specific LacZ activity from nonspecific (endogenous) galactosidase activity. *Toxicol Pathol*, 36, 265-76.
- BRAHIMI-HORN, C. & POUYSSEGUR, J. 2006. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*, 93, E73-80.
- BRAHIMI-HORN, M. C., CHICHE, J. & POUYSSEGUR, J. 2007. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)*, 85, 1301-7.
- BURGESS, D. J., DOLES, J., ZENDER, L., XUE, W., MA, B., MCCOMBIE, W. R., HANNON, G. J., LOWE, S. W. & HEMANN, M. T. 2008. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 9053-8.
- CALEY, A., & JONES, R. 2012. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 30(4), 186-190.
- CHABNER, B. A. & ROBERTS, T. G., JR. 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 65-72.
- CHEN, L., FENG, P., LI, S., LONG, D., CHENG, J., LU, Y. & ZHOU, D. 2009. Effect of hypoxia-inducible factor-1 α silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochem Res*, 34, 984-90.
- CHOWDHURY, I., THARAKAN, B. & BHAT, G. K. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151, 10-27.
- COLEY, H. M., AMOS, W. B., TWENTYMAN, P. R. & WORKMAN, P. 1993. Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines. *Br J Cancer*, 67, 1316-23.
- COSSE, J. P. & MICHIELS, C. 2008. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem*, 8, 790-7.
- COSSE, J. P., SERMEUS, A., VANNUVEL, K., NINANE, N., RAES, M. & MICHIELS, C. 2007. Differential effects of hypoxia on etoposide-induced apoptosis according to the cancer cell lines. *Mol Cancer*, 6, 61.
- DUYNDAM, M. C., VAN BERKEL, M. P., DORSMAN, J. C., ROCKX, D. A., PINEDO, H. M. & BOVEN, E. 2007. Cisplatin and doxorubicin repress Vascular Endothelial Growth Factor expression and differentially down-regulate Hypoxia-inducible Factor I activity in human ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 74, 191-201.
- EL-DEIRY, W. S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*, 8, 345-57.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.

- EVANS, S. M., SCHRLAU, A. E., CHALIAN, A. A., ZHANG, P. & KOCH, C. J. 2006. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *J Invest Dermatol*, 126, 2596-606.
- FANG, Y., SULLIVAN, R. & GRAHAM, C. H. 2007. Confluence-dependent resistance to doxorubicin in human MDA-MB-231 breast carcinoma cells requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Exp Cell Res*, 313, 867-77.
- FARRELL, A. 2011. A close look at cancer. *Nat Med*, 17, 262-5.
- FLAMANT, L., ROEGIERS, E., PIERRE, M., HAYEZ, A., STERPIN, C., DE BACKER, O., ARNOULD, T., POUMAY, Y. & MICHIELS, C. 2012. TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC Cancer*, 12, 391.
- FUCHS, Y. & STELLER, H. 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147, 742-58.
- GERBER, P. A., HEVEZI, P., BUHREN, B. A., MARTINEZ, C., SCHRUMPF, H., GASIS, M., GREITHER-BECK, S., KRUTMANN, J., HOMEY, B. & ZLOTNIK, A. 2013. Systematic identification and characterization of novel human skin-associated genes encoding membrane and secreted proteins. *PLoS One*, 8, e63949.
- GEWIRTZ, D. A. 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 57, 727-41.
- GORDAN, J. D. & SIMON, M. C. 2007. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev*, 17, 71-7.
- GREENHALGH, T. a., & SYMONDS, R. P. 2014. Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 24(9), 259-265.
- GWYNNE, S., & STAFFURTH, J. 2012. Principles of cancer treatment by radiotherapy. *Surgery (Oxford)*, 30(4), 191-193.
- HAJDU, S. I. 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117, 1097-102.
- HAJDU, S. I. 2012. A note from history: landmarks in history of cancer, part 4. *Cancer*, 118, 4914-28.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HARRIS, A. L. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2, 38-47.
- HARRISON, L. & BLACKWELL, K. 2004. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist*, 9 Suppl 5, 31-40.
- HAYEZ, A., MALAISSE, J., ROEGIERS, E., REYNIER, M., RENARD, C., HAFTEK, M., GEENEN, V., SERRE, G., SIMON, M., DE ROUVROIT, C. L., MICHIELS, C. & POUMAY, Y. 2014. High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. *Exp Dermatol*, 23, 339-44.
- HENGARTNER, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- HOLOHAN, C., VAN SCHAEYBROECK, S., LONGLEY, D. B. & JOHNSTON, P. G. 2013. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 13, 714-26.
- HOPFL, G., OGUNSHOLA, O. & GASSMANN, M. 2004. HIFs and tumors--causes and consequences. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, R608-23.
- HUANG, Z. 2002. The chemical biology of apoptosis. Exploring protein-protein interactions and the life and death of cells with small molecules. *Chem Biol*, 9, 1059-72.
- HUERTA, S., GOULET, E. J., HUERTA-YEPEZ, S. & LIVINGSTON, E. H. 2007. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res*, 139, 143-56.

- HUERTA, S., GOULET, E. J. & LIVINGSTON, E. H. 2006. Colon cancer and apoptosis. *Am J Surg*, 191, 517-26.
- IGNEY, F. H. & KRAMMER, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2, 277-88.
- INDRAN, I. R., TUFO, G., PERVAIZ, S. & BRENNER, C. 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 735-45.
- KAELIN, W. G., JR. 2008. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer*, 8, 865-73.
- KALAYDA, G. V., WAGNER, C. H., BUSS, I., REEDIJK, J. & JAEHDE, U. 2008. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*, 8, 175.
- KAPLAN, H. S. 1979. Historic milestones in radiobiology and radiation therapy. *Semin Oncol*, 6, 479-89.
- KARPINICH, N. O., TAFANI, M., ROTHMAN, R. J., RUSSO, M. A. & FARBER, J. L. 2002. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem*, 277, 16547-52.
- KE, Q. & COSTA, M. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70, 1469-80.
- KENNEDY, K. A., SIEGFRIED, J. M., SARTORELLI, A. C. & TRITTON, T. R. 1983. Effects of anthracyclines on oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res*, 43, 54-9.
- KERR, J. F., WINTERFORD, C. M. & HARMON, B. V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73, 2013-26.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- LAGE, H. 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3145-67.
- LARSEN, A. K., ESCARGUEIL, A. E. & SKLADANOWSKI, A. 2000. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther*, 85, 217-29.
- LEE, S., STEWART, S., NAGTEGAAL, I., LUO, J., WU, Y., COLDITZ, G., MEDINA, D. & ALLRED, D. C. 2012. Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer Res*, 72, 4574-86.
- LIN, Z. P., JOHNSON, D. R., FINCH, R. A., BELINSKY, M. G., KRUH, G. D. & SARTORELLI, A. C. 2002. Comparative study of the importance of multidrug resistance-associated protein 1 and P-glycoprotein to drug sensitivity in immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cancer Ther*, 1, 1105-14.
- MELET, A., SONG, K., BUCUR, O., JAGANI, Z., GRASSIAN, A. R. & KHOSRAVI-FAR, R. 2008. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol*, 615, 47-79.
- MICHELIS, C. 2004. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol*, 164, 1875-82.
- MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G. & GIANNI, L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56, 185-229.
- MURRAY, L. J., & ROBINSON, M. H. 2011) Radiotherapy: technical aspects. *Medicine*, 39(12), 698-704.
- NICHOLSON, D. W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.

- NICHOLSON, D. W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.
- OWATARI, S., AKUNE, S., KOMATSU, M., IKEDA, R., FIRTH, S. D., CHE, X. F., YAMAMOTO, M., TSUJIKAWA, K., KITAZONO, M., ISHIZAWA, T., TAKEUCHI, T., AIKOU, T., MERCER, J. F., AKIYAMA, S. & FURUKAWA, T. 2007. Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. *Cancer Res*, 67, 4860-8.
- PAPAC, R. J. 2001. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med*, 74, 391-8.
- PARK, E. J., KWON, H. K., CHOI, Y. M., SHIN, H. J. & CHOI, S. 2012. Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of pERK-dependent ATF3. *PLoS One*, 7, e44990.
- PIRET, J. P., MOTTET, D., RAES, M. & MICHIELS, C. 2002. Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol*, 64, 889-92.
- QUINTERO, M., MACKENZIE, N. & BRENNAN, P. A. 2004. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol*, 30, 465-8.
- REBUCCI, M. & MICHIELS, C. 2013. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol*, 85, 1219-26.
- REED, M. 2009. Principles of cancer treatment by surgery. *Surgery (Oxford)*, 27(4), 178-181.
- REZVANI, H. R., ALI, N., NISSEN, L. J., HARFOUCHE, G., DE VERNEUIL, H., TAIEB, A. & MAZURIER, F. 2011. HIF-1 α in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders. *J Invest Dermatol*, 131, 1793-805.
- RILEY, T., SONTAG, E., CHEN, P. & LEVINE, A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 402-12.
- RUPINDER, S. K., GURPREET, A. K. & MANJEET, S. 2007. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol*, 46, 383-93.
- RYAN, K. M., PHILLIPS, A. C. & VOUSDEN, K. H. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 332-7.
- SAIKUMAR, P., DONG, Z., MIKHAILOV, V., DENTON, M., WEINBERG, J. M. & VENKATACHALAM, M. A. 1999. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, 107, 489-506.
- SCHOFIELD, C. J. & RATCLIFFE, P. J. 2004. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 343-54.
- SCHULTZ, D. R. & HARRINGTON, W. J., JR. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*, 32, 345-69.
- SEMENZA, G. L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3, 721-32.
- SEMENZA, G. L. 2009. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*, 24, 97-106.
- SHEN, D. W. & GOTTESMAN, M. M. 2012. RAB8 enhances TMEM205-mediated cisplatin resistance. *Pharm Res*, 29, 643-50.
- SHEN, D. W., MA, J., OKABE, M., ZHANG, G., XIA, D. & GOTTESMAN, M. M. 2010. Elevated expression of TMEM205, a hypothetical membrane protein, is associated with cisplatin resistance. *J Cell Physiol*, 225, 822-8.
- SHIMAZAKI, K., UCHIDA, T., KOMINE, A. & TAKAHASHI, K. 2012. p53 Retards cell-growth and suppresses etoposide-induced apoptosis in Pin1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 422, 133-8.
- SONG, X., LIU, X., CHI, W., LIU, Y., WEI, L., WANG, X. & YU, J. 2006. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene. *Cancer Chemother Pharmacol*, 58, 776-84.
- STRASSER, A., O'CONNOR, L. & DIXIT, V. M. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69, 217-45.

- STRESE, S., FRYKNAS, M., LARSSON, R. & GULLBO, J. 2013. Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. *BMC Cancer*, 13, 331.
- SUDHAKAR, A. 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1, 1-4.
- THORN, C. F., OSHIRO, C., MARSH, S., HERNANDEZ-BOUSSARD, T., MCLEOD, H., KLEIN, T. E. & ALTMAN, R. B. 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, 21, 440-6.
- THORNBERRY, N. A. 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*, 5, R97-103.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-6.
- TREDAN, O., GALMARINI, C. M., PATEL, K. & TANNOCK, I. F. 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, 99, 1441-54.
- VAN MAANEN, J. M., RETEL, J., DE VRIES, J. & PINEDO, H. M. 1988. Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst*, 80, 1526-33.
- VOGELSTEIN, B., LANE, D. & LEVINE, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.
- VOUSDEN, K. H. & LANE, D. P. 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 275-83.
- WANG, S., KONOREV, E. A., KOTAMRAJU, S., JOSEPH, J., KALIVENDI, S. & KALYANARAMAN, B. 2004. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*, 279, 25535-43.
- WANG, S., SONG, P. & ZOU, M. H. 2012. Inhibition of AMP-activated protein kinase alpha (AMPKalpha) by doxorubicin accentuates genotoxic stress and cell death in mouse embryonic fibroblasts and cardiomyocytes: role of p53 and SIRT1. *J Biol Chem*, 287, 8001-12.
- WANG, Z., XU, J., ZHOU, J. Y., LIU, Y. & WU, G. S. 2006. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res*, 66, 8870-7.
- WEIDEMANN, A. & JOHNSON, R. S. 2008. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*, 15, 621-7.
- WEISS, D. J., LIGGITT, D. & CLARK, J. G. 1999. Histochemical discrimination of endogenous mammalian beta-galactosidase activity from that resulting from lac-Z gene expression. *Histochem J*, 31, 231-6.
- WENGER, R. H. 2002. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*, 16, 1151-62.
- WIRTHNER, R., WRANN, S., BALAMURUGAN, K., WENGER, R. H. & STIEHL, D. P. 2008. Impaired DNA double-strand break repair contributes to chemoresistance in HIF-1 alpha-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis*, 29, 2306-16.
- WU, Q., YANG, Z., NIE, Y., SHI, Y. & FAN, D. 2014. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches. *Cancer Lett*, 347, 159-66.
- WU, R. C., QIN, J., YI, P., WONG, J., TSAI, S. Y., TSAI, M. J. & O'MALLEY, B. W. 2004. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell*, 15, 937-49.
- YANG, W., PARK, I. J., YUN, H., IM, D. U., OCK, S., KIM, J., SEO, S. M., SHIN, H. Y., VIOLLET, B., KANG, I., CHOE, W., KIM, S. S. & HA, J. 2014. AMP-activated protein kinase alpha2 and E2F1 transcription factor mediate doxorubicin-induced cytotoxicity by forming a positive signal loop in mouse embryonic fibroblasts and non-carcinoma cells. *J Biol Chem*, 289, 4839-52.

- YOULE, R. J. & STRASSER, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 47-59.
- YU, J. & ZHANG, L. 2005. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun*, 331, 851-8.
- ZIMMERMANN, K. C., BONZON, C. & GREEN, D. R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 92, 57-70.

Webographie

BioGPS. Consulté le 15 septembre 2014.

Disponible à partir de <http://biogps.org/#goto=genereport&id=55076>

Ensembl. Consulté le 22 octobre 2014.

Disponible à partir de

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000181458;r=3:100211463-100296288

Organisme Mondial de la Santé. Consulté le 2 décembre 2014

Disponible à partir de <http://www.who.int/topics/cancer/fr/>