



HAL
open science

Le transcriptome ABC dans la différenciation, la détoxification et la chimiorésistance.

Edith Garrido

► **To cite this version:**

Edith Garrido. Le transcriptome ABC dans la différenciation, la détoxification et la chimiorésistance..
Biochimie, Biologie Moléculaire. Ecole Polytechnique X, 2007. Français. NNT : . pastel-00003651

HAL Id: pastel-00003651

<https://pastel.hal.science/pastel-00003651>

Submitted on 23 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole Polytechnique

Thèse de doctorat

Spécialité biologie

Présentée par

Edith GARRIDO

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences
de l'École Polytechnique

Le transcriptome ABC
dans la différenciation, la détoxification
et la chimiorésistance

Directeur de thèse : M. Jean-Yves LALLEMAND

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette

Soutenue le 25 octobre 2007 devant le jury composé de :

MM. Attilio DI PIETRO	Président
Karen LEROY	Rapporteur
Jean-Michel SCHERRMANN	Rapporteur
Patrice ALLARD	Examineur
Jean-Yves LALLEMAND	Examineur
Eric JACQUET	Examineur

Merci !

Ces quelques lignes vont me permettre de remercier toutes les personnes qui m'ont beaucoup apporté au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui mon travail n'aurait pu aboutir : les collègues et amis du « labo », et bien entendu mon entourage et ma famille qui m'ont accompagné et encouragé tout au long de la thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Yves Lallemand, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir donné les moyens de mener à bien mes travaux de recherche.

Je remercie également Eric Jacquet pour m'avoir encadré. Eric, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi : tu as été présent tout au long de ma thèse et tu as su rendre ce travail très intéressant. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, pour nos discussions scientifiques, ou celles qui l'étaient beaucoup moins.

Je remercie Karen Leroy et Jean-Michel Scherrmann pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs, pour avoir analysé avec minutie ce mémoire et pour l'intérêt scientifique évident qu'ils ont manifestés.

Je remercie également Attilio Di Pietro qui a accepté de présider le jury ainsi que Patrice Allard pour sa participation comme examinateur.

La thèse est un exercice difficile, j'ai cependant eu la chance d'être très bien entourée et je tenais à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue (voire supportée) durant toutes ces années.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de l'équipe ABC2 qui ont su m'aider et qui m'ont accueillie dans le laboratoire.

- Naïma, merci pour pleins de raisons, mais surtout pour ton énergie, ton aide, ton enthousiasme, ton amitié et pour tout les fous rires que nous avons eu.

- Christina, tu as été présente tout au long de ma thèse, merci pour ta gentillesse, ta patience, ta disponibilité et ta bonne humeur.

- Annie, merci pour ton aide lors des manip's (le Western n'a plus de secret pour toi !) et pour tout le soutien que tu m'as apporté. Merci pour les tongs, comme tout sudiste qui se respecte je les mettrais pour aller à la plage !

- Jean-Marie je me rappellerai des batailles d'eau et de glace (Brrr !!), de ta ponctualité légendaire, mais aussi de tous les paquets de Michokos que tu as perdu en pariant (ahah !).

Je tiens également à remercier les équipes avec qui nous avons collaboré pour mener à bien ce travail :

- L'équipe de Jacques Hatzfeld qui a participé au projet « cellules souches ». Un grand merci à Antoinette et Romain.

- L'équipe de Jean-Pierre Marie, merci à Christophe Marzac et Ollivier Legrand.

- L'équipe de Thierry Cresteil. Je tiens à remercier particulièrement Laure avec qui j'ai eu la chance de travailler pour le projet « foies ».

Merci au Bât23b où il règne une ambiance joyeuse. Pour tout ces moments de joie au labo, pour toutes les soirées et les sorties accrobranches et paintball. Au sein de ce bâtiment, j'ai

eu l'occasion de rencontrer des personnes que j'ai la chance de pouvoir considérer comme mes amis aujourd'hui :

Un grand merci à Pierre (La Momie, petit Padawan, Pierre Vassiliu et j'en passe...), Pascale (Docteur Pascalou), Sandrine, Laetitia (Laetylove-Blonde inside...), Stéphane, Matthieu, Mahoney, Louise, Damiana, Aude, Gilles, Cube, Olivier, Clotilde, Aurélien, Alda, Vanessa, Sophie, Fabien, Dirk et, last but not least, Benoît (dit Binouille).

Delphine, merci pour tout ce que tu m'as apporté : pour ton aide lors des « manips souris », mais aussi pour ton amitié.

Enfin comme dans toute bonne histoire, des animaux (plus ou moins sympathiques) sont intervenus :

- Momo le homard que nous avons essayé de sauver et qui comme tout bon homard bien cuit avait une couleur rouge vif.*
- Le chat (chou) de Pierre à qui on avait envie de gratouiller le ventre (au chat, pas à Pierre...).*
- Shpritz, Flitzi et Fluffy les hamsters.*
- La blatte géante qui nous a attaqué Sandrine et moi au détour d'un couloir (merci Clothilde de nous avoir sauvées).*
- La dinde et la pintade, ces animaux de bassecour faisaient décidément trop de bruit !*
- Les souris qui ont participées (malgré elles) à cette thèse...*

Une pensée spéciale à toute ma famille qui m'a soutenue et encouragée : mes parents, ma sœur Myriam, ainsi que mes grands parents. Je remercie également Evelyne et Jean-Pierre d'être venu me soutenir « le jour J ».

Et bien sûr merci à Jean-Denis pour sa patience, sa gentillesse et son soutien sans faille durant toute cette période.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
CHAPITRE I INTRODUCTION GENERALE.....	17
I LA FAMILLE DES TRANSPORTEURS ABC.....	17
II ORGANISATION DES TRANSPORTEURS ABC.....	19
III TRANSPORTEURS ABC : FONCTIONS ET MALADIES ASSOCIEES.....	20
IV CONTEXTE BIOLOGIQUE ET PROBLEMATIQUE	28
VBIBLIOGRAPHIE.....	30
CHAPITRE II LA PCR QUANTITATIVE.....	35
I PRINCIPE DE PCR.....	35
1 HISTORIQUE.....	36
2 UNE APPLICATION : LA PCR QUANTITATIVE	37
2.1 <i>Le SYBR Green</i>	39
2.2 <i>La chimie Taqman</i>	39
II METHODES UTILISEES AU LABORATOIRE.....	40
1 PCR SYBR GREEN.....	40
1.1 <i>Description de la technique</i>	40
1.2 <i>Gamme de dilution et efficacité de la réaction</i>	41
1.3 <i>Dessin des amorces</i>	43
1.4 <i>Spécificité des amorces</i>	43
1.5 <i>Inconvénients de la technique SYBR Green-I</i>	44
2 PUCE A OLIGONUCLEOTIDES	44
2.1 <i>Elaboration de la puce : critères de choix d'une sonde</i>	45
2.2 <i>Description de notre puce à oligonucléotides</i>	45
2.3 <i>Exemple de résultats obtenus sur la puce à oligonucléotides</i>	46
2.4 <i>Inconvénients de la technique de puce à oligonucléotides</i>	47
3 PCR QUANTITATIVE TAQMAN	47
3.1 <i>Sondes TaqMan MGB</i>	48
3.2 <i>Cartes microfluidiques ou TLDA</i>	48
3.3 <i>Vérification de chaque courbe d'amplification et détermination du seuil</i>	48
3.4 <i>Reproductibilité de la PCR utilisant les sondes ABC transporteurs</i>	49
3.5 <i>Recherche des meilleurs gènes de référence pour la normalisation</i>	50
3.6 <i>Calcul de la quantification relative</i>	54
3.7 <i>Calcul de l'efficacité</i>	54
III BIBLIOGRAPHIE	60

CHAPITRE III EFFET DE LA COLCHICINE SUR L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC 65

I INTRODUCTION 65

1	LA COLCHICINE	65
2	LA MUCOVISCIDOSE.....	65
2.1	<i>Historique</i>	65
2.2	<i>Epidémiologie, Diagnostic et Symptômes.</i>	66
2.3	<i>Pronostic</i>	67
2.4	<i>Implication du canal CFTR/ABCC7</i>	68
2.5	<i>Stratégies de correction des phénotypes CF</i>	69
3	INTERET DE LA COLCHICINE POUR LE TRAITEMENT DE LA MUCOVISCIDOSE.....	69

II MODELES D'ETUDE..... 70

III RESULTATS 71

1	RESULTATS <i>IN VITRO</i> : TRAITEMENT DE CELLULES HL60 ET K562 PAR LA COLCHICINE.....	71
1.1	<i>Traitements effectués</i>	71
1.2	<i>Choix des meilleurs gènes de référence</i>	71
1.3	<i>Incidence du traitement sur l'expression des transporteurs ABC</i>	72
2	RESULTATS <i>IN VIVO</i> : TRAITEMENT DE SOURIS C57Bl6 PAR LA COLCHICINE	75
2.1	<i>Traitements effectués</i>	75
2.2	<i>Gènes d'intérêt testés</i>	75
2.3	<i>Choix des meilleurs gènes de référence</i>	75
2.4	<i>Comparaison de l'expression des transporteurs ABC dans les organes non traités de souris</i>	77
2.5	<i>Variations d'expression induites par le traitement de souris par la colchicine</i>	81
2.6	<i>Dans l'intestin</i>	84

IV DISCUSSION..... 86

V BIBLIOGRAPHIE..... 91

CHAPITRE IV LES TRANSPORTEURS ABC AU COURS DU DEVELOPPEMENT HEPATIQUE..... 97

I INTRODUCTION 97

1	LE FOIE FŒTAL	97
1.1	<i>Le développement du foie</i>	97
1.2	<i>Elimination de xénobiotiques par le foie fœtal</i>	98
2	FONCTIONS DU FOIE ADULTE	98
2.1	<i>Métabolique</i>	98
2.2	<i>Production de la bile</i>	99
2.3	<i>Détoxication</i>	99
3	IMPORTANCE DES TRANSPORTEURS ABC DANS LE FOIE	100

II RESULTATS 101

4	CHOIX DES GENES DE REFERENCE.....	102
5	PROFILS D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC	103

III DISCUSSION..... 112

III ANNEXE 1 116

IV ANNEXE 2 122

IV BIBLIOGRAPHIE 123

CHAPITRE V : EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC DANS DES CELLULES SOUCHES HUMAINES..... 129

I INTRODUCTION 129

1 LES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES 129

2 CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES 131

 2.1 *Historique*..... 131

 2.2 *Loi Française* 131

 2.3 *Obtention de cellules souches embryonnaires*..... 131

 2.4 *Différenciation de cellules souches embryonnaires* 132

 2.5 *Des résultats encourageants chez l'animal*..... 132

3 LES CELLULES SOUCHES ADULTES 132

4 LES CELLULES SOUCHES : DE LA RECHERCHE FONDAMENTALE A LA RECHERCHE CLINIQUE 133

5 LES TRANSPORTEURS ABC DANS LES CELLULES SOUCHES 133

II RESULTATS..... 136

1 CHOIX DES GENES DE REFERENCE..... 136

2 PROFILS D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC 138

3 QUANTIFICATION RELATIVE 142

IV DISCUSSION..... 143

V ANNEXE..... 147

VII BIBLIOGRAPHIE..... 154

CHAPITRE VI : LES TRANSPORTEURS ABC ET LA CHIMIORESISTANCE DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOBLASTIQUES..... 161

I INTRODUCTION 161

1 GENERALITES 161

2 ETIOLOGIE 161

 2.1 *Facteurs génétiques*..... 162

 2.2 *Facteurs environnementaux* 162

3 SYMPTOMES ET DIAGNOSTIC 163

 3.1 *Etats pré-cliniques*..... 163

 3.2 *Signes cliniques*..... 163

 3.3 *Diagnostic hématologique*..... 163

 3.4 *Facteurs de pronostic*..... 164

4 TRAITEMENTS..... 165

5 LEUCEMIES ET ROLE DES TRANSPORTEURS ABC DANS LES MECANISMES DE MULTIRESISTANCE AUX CHIMIOETHERAPIES 167

II METHODES 169

1 PATIENTS LAM TESTES ET DEFINITION DE GROUPES 169

2 OUTILS, METHODES ET NORMALISATION DES EXPERIENCES DE QPCR 171

 2.1 *Transporteurs ABC étudiés* 171

 2.2 *Choix des gènes de référence* 171

III RESULTATS 175

1 PROFIL D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC DANS LES LAM 175

2 QUANTIFICATION RELATIVE DE CHAQUE TRANSPORTEUR ABC..... 177

IV DISCUSSION..... 180

V BIBLIOGRAPHIE..... 184

CHAPITRE VII : PROFIL D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC DANS DES LIGNEES CELLULAIRES SENSIBLES ET RESISTANTES..... 191

I INTRODUCTION 191

1	LA CELLULE CANCEREUSE.....	191
2	UN TRAITEMENT ANTICANCEREUX : LA CHIMIOETHERAPIE.....	193
2.1	<i>Historique de la chimiothérapie anticancéreuse.....</i>	<i>193</i>
2.2	<i>La réponse aux chimiothérapies anticancéreuses.....</i>	<i>194</i>
2.3	<i>Le phénomène de chimiorésistance.....</i>	<i>194</i>
2.4	<i>Un modèle d'étude de chimiorésistance : les lignées cellulaires résistantes.....</i>	<i>195</i>

II RESULTATS..... 195

1	LIGNEES CELLULAIRES TESTEES.....	195
2	CHOIX DES GENES DE REFERENCE.....	197
3	CALCUL DU RATIO D'EXPRESSION RQ.....	199
4	CYTOMETRIE DE FLUX.....	201
5	QUANTIFICATION DU TRANSPORTEUR ABCB4.....	203
6	ESTIMATION DU NOMBRE DE COPIES DE TRANSCRIT PAR CELLULE.....	204
6.1	<i>Utilisation d'une gamme étalon.....</i>	<i>204</i>
6.2	<i>Calcul du nombre de copies d'ARN par cellules en utilisant l'ARN ribosomal 18S.....</i>	<i>212</i>

III DISCUSSION..... 212

IV ANNEXE 217

V BIBLIOGRAPHIE..... 219

DISCUSSION GENERALE 221

MATERIELS ET METHODES..... 225

1	MATERIEL BIOLOGIQUE.....	225
1.1	<i>Animaux :.....</i>	<i>225</i>
1.2	<i>Les lignées cellulaires :.....</i>	<i>225</i>
1.3	<i>Les échantillons de foies humains :.....</i>	<i>226</i>
1.4	<i>Les échantillons de blastes humains.....</i>	<i>226</i>
2	MANIPULATION D'ARN :.....	226
2.1	<i>Extraction d'ARN.....</i>	<i>227</i>
2.2	<i>Dosage, contrôle de la pureté, de la stabilité et stockage des ARN.....</i>	<i>228</i>
3	PUCES A ADN.....	228
3.1	<i>Blocage des lames.....</i>	<i>228</i>
3.2	<i>Synthèse et marquage des ADNc.....</i>	<i>229</i>
3.3	<i>Hybridation - Lavages.....</i>	<i>229</i>
3.4	<i>Acquisition d'images en fluorescence.....</i>	<i>230</i>
4	PCR QUANTITATIVE.....	231
4.1	<i>PCR en SYBR Green.....</i>	<i>231</i>
4.2	<i>PCR Taqman.....</i>	<i>232</i>
5	ANALYSE PAR CYTOMETRIE DE FLUX.....	232

Liste des Abréviations

ABC	<i><u>A</u>TP <u>B</u>inding <u>C</u>assette</i>
NBD	<i><u>N</u>ucleotide <u>B</u>inding <u>D</u>omain</i>
TMD	<i><u>T</u>rans<u>m</u>embrane <u>D</u>omain</i>
MDR	<i><u>M</u>ultidrug <u>R</u>esistance protein</i>
MRP	<i><u>M</u>ultidrug <u>R</u>esistance <u>A</u>ssociated <u>P</u>rotein</i>
CFTR	<i><u>C</u>ystic <u>F</u>ibrosis <u>T</u>ransmembrane conductance <u>R</u>egulator</i>
ATP	<i><u>A</u>denosine <u>T</u>riphosphate</i>
ADN	<i><u>A</u>cide <u>D</u>éoxyribo<u>n</u>ucléique</i>
ADNc	ADN complémentaire
ARN	<i><u>A</u>cide <u>R</u>ibo<u>n</u>ucléique</i>
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Outil de recherche d'alignements)
BrEt	Bromure d'éthidium
Ct	<i>Threshold cycle</i> Cycle-seuil
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Réaction de polymérisation en chaîne
qPCR	PCR quantitative
TLDA	TaqMan Low Density Array
RT	Transcription inverse
RQ	Quantification relative
Tm	Température de fusion
LAM	Leucémie aigue myélobastique
ES	<i>Embryonic Stem Cell</i>
EB	<i>Embryoid Body</i>
hES	<i>human <u>E</u>mbryonic <u>S</u>tem Cell</i>
MSC	<i><u>M</u>esenchymal <u>S</u>tem Cell</i>
Kb	<u>k</u> ilo paire de <u>b</u> ase
kDa	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton

Chapitre I

Introduction générale

Chapitre I Introduction générale

I LA FAMILLE DES TRANSPORTEURS ABC

Les membranes cellulaires permettent la communication entre le cytoplasme de la cellule et le milieu extracellulaire. La différence de composition entre le cytoplasme et son milieu externe n'est possible que grâce à une perméabilité sélective de cette membrane plasmique. En effet, certaines protéines membranaires sont des canaux ioniques ou des transporteurs passifs autorisant le passage de constituants selon leur gradient électrochimique. Il existe également des systèmes de transport actif permettant le transport de substances contre leur gradient de concentration. Parmi ces transporteurs actifs, la famille des transporteurs à ATP-binding cassette (ABC) est la plus représentative.

La famille des transporteurs ABC est l'une des plus vastes familles de protéines. Ces transporteurs ont été découverts et étudiés dans les bactéries dès les années 1950 mais ce n'est que vers 1990 que leur présence a été établie dans tout le règne vivant, de la bactérie à l'homme, en passant par les plantes (Higgins 1992). Cinquante et un membres ont été décrits dans cette famille de gènes chez l'homme, mais à ce jour cette famille comporterait 48 gènes fonctionnels, 2 pseudogènes et un gène dont la séquence de référence a été retirée des banques de données (Dean *et al.* 2001). Cette famille est divisée en sept sous-familles allant de la sous famille A jusqu'à la sous famille G (Tableau 1) (Dean and Annilo 2005).

Sous famille	Gènes	Synonymes	Locus
ABCA/ABC1	ABCA1	ABC1, TGD, HDLDT1, CERP	9q31.1
	ABCA2	ABC2	9q34
	ABCA3	ABC-C, ABC3	16p13.3
	ABCA4	ABCR, RP19, ABC10, FFM, STGD1, STGD, CORD3, RMP	1p22.1-p21
	ABCA5	ABC13	17q24.3
	ABCA6		17q24.3
	ABCA7	ABCX, ABCA-SSN	19p13.3
	ABCA8		17q24
	ABCA9		17q24
	ABCA10		17q24
	ABCA11	(pseudogène)	4p16.3
	ABCA12		2q34
	ABCA13		7p12.3
ABCB/MDR	ABCB1	MDR1, P-gp, ABC20, GP170, PGY1	7q21.1
	ABCB2	TAP1, PSF1, RING4, ABC17, APT1, D6S114E	6p21.3
	ABCB3	TAP2, PSF2, RING11, D6S217E, ABC18	6p21.3
	ABCB4	PGY3, MDR2/3, MDR3, PFIC-3, ABC21	7q21.1
	ABCB5		7p15.3
	ABCB6	ABC14, UMAT, MTABC3, PRP	2q36
	ABCB7	ABC7, ATM1P, ASAT	Xq12-q13
	ABCB8	M-ABC1	7q36
	ABCB9	TAPL	12q24
	ABCB10	M-ABC2, MTABC2	1q42
	ABCB11	BSEP, ABC16, PFIC-2, PFIC2, PGY4, SPGP	2q24
ABCC/MRP	ABCC1	MRP, MRP1, ABCC, ABC29, GS-X	16p13.1
	ABCC2	MRP2, CMOAT, ABC30	10q24
	ABCC3	MRP3, cMOAT2, MOAT-D, ABC31, MLP2	17q22
	ABCC4	MRP4, MOAT-B, MOATB,	13q32
	ABCC5	MRP5, ABC33, MOAT-C, MOATC, SMRP, pABC11	3q27
	ABCC6	MRP6, ABC34, ARA, MLP1, MOATE, PXE, PXE1	16p13.1
	ABCC7	CFTR, MRP7, CFTR/MRP, CF, ABC35, TNR-CFTR,	7q31.2
	ABCC8	SUR1, SUR, MRP8, ABC36, HHF1, HI, HRINS, PHHI	11p15.1
	ABCC9	SUR2, ABC37, CMD1O, FLJ36852	12p12.1
	ABCC10	MRP7	6p21.1
	ABCC11	MRP8	16q12.1
	ABCC12	MRP9	16q12.1
	ABCC13	PRED6 (pseudogène)	21q11.2
ABCD/ALD	ABCD1	ALD, ALDP, ABC42, AMN	Xq28
	ABCD2	ALDL1, ALDR, ABC39, ALDRP, hALDR	12q11-q12
	ABCD3	PXMP1, PMP70, ABC43	1p22-p21
	ABCD4	PXMP1L, P70R, ABC41, EST352188, P79R, PMP69,	14q24.3
ABCE/OABP	ABCE1	RNASL1, OABP, ABC38, RLI, RNASEL1, RNS4I	4q31
ABCF/GCN20	ABCF1	ABC50, ABC27	6p21.33
	ABCF2	ABC28, HUSSY-18, M-ABC1	7q36
	ABCF3		3q27.1
ABCG/White	ABCG1	ABC8, WHITE1	21q22.3
	ABCG2	BCRP, BCRP1, MRX, MXR, MXR1, ABC15, ABCP, BMDP,	4q22
	ABCG3 ?	Séquence retirée	
	ABCG4	WHITE2	11q23.3
	ABCG5	WHITE3, Sterolin1	2p21
	ABCG8	WHITE2, Sterolin2	2p21

Tableau 1 : la famille des transporteurs ABC chez l'homme.

II ORGANISATION DES TRANSPORTEURS ABC

Les transporteurs ABC présentent de remarquables conservations dans leur séquence et dans leur organisation structurale. Les transporteurs ABC entiers sont organisés en quatre domaines : deux domaines transmembranaires (TMD pour Transmembrane domains) et deux domaines cytoplasmiques (NBD pour Nucleotide Binding Domains). Les héli-transporteurs s'assemblent en homodimère ou hétérodimère pour former un transporteur fonctionnel (Figure 1).

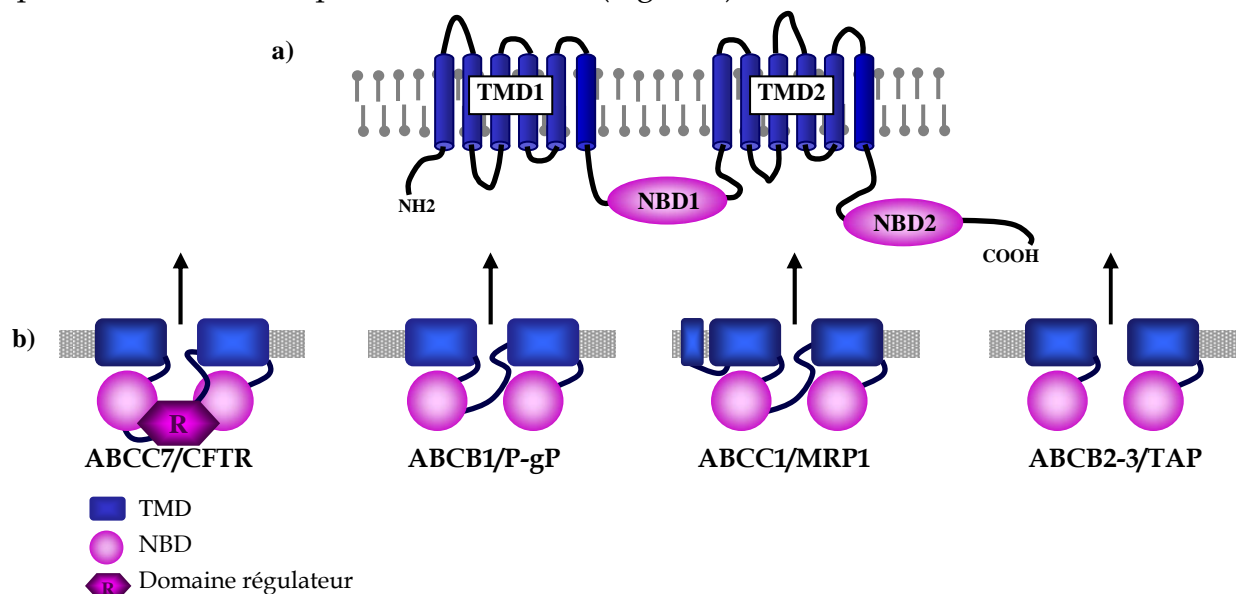


Figure 1 : Organisation schématique des transporteurs ABC.

Un transporteur ABC comporte 4 domaines : 2 domaines transmembranaires (TMD bleus) et 2 domaines de liaison des nucléotides (NBD rose). Des domaines optionnels existent chez certains transporteurs ABC, tels que les domaines régulateurs (R) ou un domaine transmembranaire supplémentaire

Les domaines transmembranaires des transporteurs ABC comportent plusieurs hélices transmembranaires. Typiquement, il y a six hélices par domaine, soit un total de douze hélices par transporteur entier. Les TMD ont un rôle essentiel dans la reconnaissance et le transport du substrat.

Les domaines cytoplasmiques NBD sont des domaines hydrophiles conservés. Ils sont impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Les NBD partagent trois motifs très conservés chez les membres de cette famille, caractérisant la « cassette » de fixation de l'ATP (Figure 2) :

- les motifs de Walker A et B qui sont les sites de liaison de l'ATP. Bien que caractéristiques, ces séquences ne sont pas spécifiques des transporteurs ABC car ils sont présents sur d'autres protéines fixant des nucléotides.
- la séquence « LSGGQ », qui constitue la « signature » spécifique des transporteurs ABC. Cette séquence est utilisée pour déterminer l'appartenance d'une protéine à cette superfamille et est située entre les sites Walkers A et B.

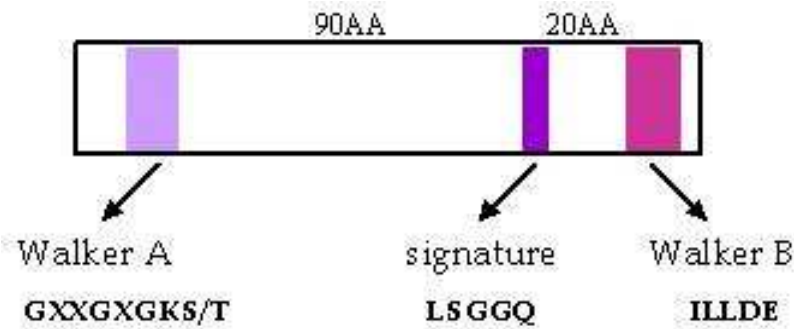


Figure 2 : Organisation des NBD des transporteurs ABC

Schéma illustrant les séquences consensus des domaines de liaison des nucléotides (NBD). Les motifs Walker A et B sont distants d'environ 110 acides aminés. La signature ABC précède le motif Walker B de 20 acides aminés. Les acides aminés les plus conservés dans ces motifs sont indiqués au dessous.

Les protéines ABC utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour le transport unidirectionnel de substrats. Considérant que des transporteurs ABC bactériens sont impliqués dans l'import et l'export ; ceux décrits chez les eucaryotes semblent la plupart du temps spécialisés dans l'export.

III TRANSPORTEURS ABC : FONCTIONS ET MALADIES ASSOCIEES

Les transporteurs ABC sont impliqués dans le transport d'un grand nombre de substances biologiques (peptides, hormones, sucres, ions, cholestérol...) et régulent des processus biologiques très divers. En catalysant le transport des lipides d'un côté à l'autre de la bicouche lipidique ils participent à la biogenèse et l'entretien des membranes. Ils transportent des peptides pour le Complexe Majeur d'Histocompatibilité et participent ainsi à la défense immunitaire de l'organisme. Leur présence au niveau de la glande mammaire et du placenta leur permet d'intervenir dans les échanges mère-foetus. Enfin, certains transporteurs ont également un rôle d'excrétion notamment dans le foie, l'intestin et le rein (Szakacs *et al.* 2006) (Figure 3).

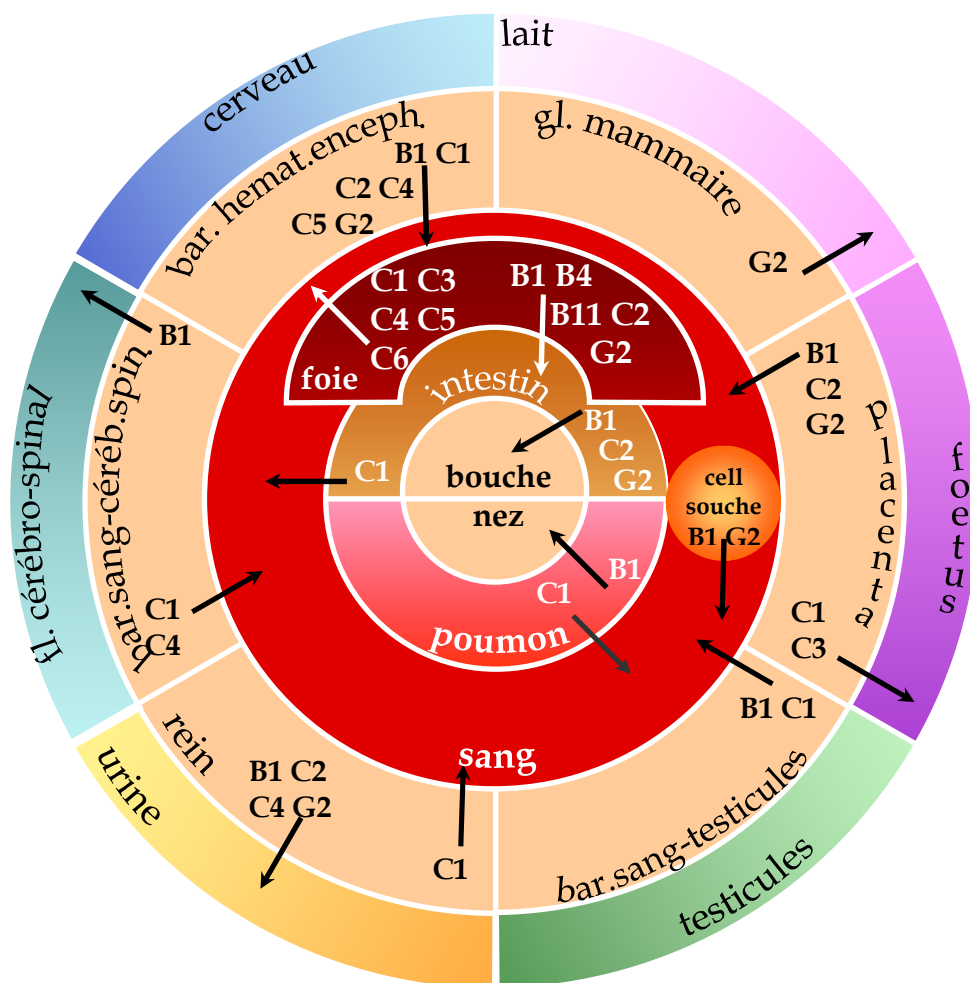


Figure 3 : Rôle pharmacologique des transporteurs ABC selon (Szakacs *et al.* 2006).

Sur les 48 transporteurs ABC connus, 22 ont été liés à des pathologies chez l'homme (Schuierer and Langmann 2005). Certaines mutations de ces transporteurs ABC sont responsables de maladies génétiques graves (Tableau 2). L'exemple le plus connu est celui de la mucoviscidose où la protéine ABCC7/CFTR est mutée.

Du fait de leur expression au niveau des barrières pharmacologiques, les protéines ABC ont également une grande importance dans la protection contre les xénobiotiques. Leur capacité à transporter des substances toxiques (métaux lourds, drogues, ...) leur donne un rôle clef dans la détoxification de l'organisme. L'expression de certains transporteurs ABC peut être responsable de nombreux phénomènes de résistance aux médicaments notamment lors de thérapies anticancéreuses. C'est le cas notamment des protéines ABC appelées MDR (Multidrug Resistance Protein) et MRP (Multidrug Resistance associated protein) dont l'expression à la membrane des cellules tumorales a été associée à une fonction de détoxification pouvant mettre en échec les traitements par chimiothérapie.

Genes	Maladies	Phénotype
ABCA1	Maladie de Tangier	Taux HDL, LDL faible Atteinte du Système coronaire
ABCA2	Maladie d'Alzheimer	Troubles neurodégénératifs
ABCA3	Détresse respiratoire néonatale	Déficience en surfactant pulmonaire
ABCA4	Maladie de Stargardt Rétinopathie pigmentaire Dégénérescence maculaire	Baisse de l'acuité visuelle
ABCA7	Syndrome de Sjögren	Sécheresse oculaire et buccale
ABCA12	Ichtyose Harlequin	Hyperkératose (tégument crouteux), troubles respiratoires, infectieux ou alimentaires
ABCB1	Ichtyose lamellaire de type II	Peau sèche Accumulation de squames
ABCB2	Déficience immunitaire	
ABCB3	Maladie de Wegener	Vascularisation nécrosante
ABCB4	Cholestase intrahépatique familiale de type 3	Insuffisance hépatique
ABCB7	Anémie sideroblastique liée à l'X	Troubles neurologiques
ABCB11	Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 2	Insuffisance hépatique
ABCC2	Syndrome de Dubin-Johnson	Ictère bénin chronique Hyperbilirubinémie
ABCC6	Pseudoxanthome élastique	Pathologie héréditaire du tissu conjonctif Calcification et fragmentation des fibres élastiques (peau, rétine, parois artérielles)
ABCC7	Mucoviscidose	Troubles respiratoires (inflammation chronique des bronches) Troubles digestifs (pancréas, intestin)
ABCC8	Hyperinsulinisme congénital de l'enfant	Hypoglycémie due à un excès d'insuline
ABCC9	Cardiomyopathie dilatée avec tachycardie ventriculaire	Insuffisance cardiaque
ABCD1	Adrénoleucodystrophie	Démyélinisation progressive du système nerveux central et insuffisance surrénale
ABCD3	Syndrome de Zellweger (type 2)	Syndrome cérébro-hépaté-rénal Leucodystrophie Absence de péroxysomes
ABCG2	Protoporphyrine érythropoïétique	Photosensibilité aiguë
ABCG5	Sitostérolémie	Hypercholestérolémie et artériosclérose coronaire prématurée
ABCG8	Sitostérolémie	Hypercholestérolémie et artériosclérose coronaire prématurée

Tableau 2 : Maladies associées aux transporteurs ABC

Les transporteurs représentés en gras sont ceux dont la mutation est clairement responsable de la pathologie. Les autres transporteurs ont été associés à la maladie.

La sous-famille ABCA

La sous-famille ABCA comprend 12 transporteurs entiers. Ils partagent de fortes homologies de conservation de séquence et sont pour la plupart liés au transport de lipides. Des mutations dans certains de ces gènes ont été décrites dans des maladies héréditaires graves comme la détresse respiratoire néonatale pour ABCA3 (Shulenin *et al.* 2004), l'ichtyose Harlequin pour ABCA12 (Kelsell *et al.* 2005), la maladie de Tangier pour ABCA1 (Brooks-Wilson *et al.* 1999; Rust *et al.* 1999) et plus récemment Alzheimer pour ABCA2 (Chen *et al.* 2004; Mace *et al.* 2005).

En outre, certains d'entre eux participent vraisemblablement à la résistance aux drogues de cellules cancéreuses (Laing *et al.* 1998; Boonstra *et al.* 2004; Graff and Pollack 2004; Hirschmann-Jax *et al.* 2004). Cette sous-famille contient les plus grandes protéines ABC connues jusqu'ici, certaines d'entre elles contiennent plus de 2 100 acides aminés et ont une masse moléculaire de plus de 200kDa.

La sous-famille ABCB

Les protéines appartenant à la sous-famille ABCB ont des fonctions et des organisations structurales très hétérogènes (Koch *et al.* 2004). Cette sous-famille comprend 11 membres parmi lesquels on trouve des transporteurs entiers et des hémi-transporteurs. Le premier transporteur, ABCB1, est un des principaux ABC cloné et caractérisé pour sa capacité à conférer un phénotype de résistance à des cellules cancéreuses (Juliano and Ling 1976; Kartner *et al.* 1985; Riordan *et al.* 1985; Roninson *et al.* 1986). Les protéines ABCB4 et ABCB11 sont présentes dans le foie et sont impliquées dans la sécrétion d'acides biliaires (Chandra and Brouwer 2004). Les gènes ABCB2 et ABCB3 (TAP1 et TAP2) sont des hémi-transporteurs qui forment un hétérodimère pour transporter des peptides dans le réticulum endoplasmique. Ces peptides seront alors présentés par les molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité. ABCB9 fait partie de la famille TAP et possède de fortes homologies avec ABCB2 et ABCB3. Il est localisé dans des lysosomes (Zhang *et al.* 2000). Les quatre autres hémi-transporteurs, ABCB6, ABCB7, ABCB8, et ABCB10, sont localisés dans les mitochondries. ABCB6 et ABCB7 participent au métabolisme du fer (Krishnamurthy *et al.* 2006; Cavadini *et al.* 2007), alors qu'ABCB8 et ABCB10 interviendraient dans le transport de peptides (Herget and Tampe 2007).

Dans cette sous-famille de protéines ABC, certaines sont responsables de désordres génétiques chez l'homme parmi lesquels l'anémie sidéroblastique liée à l'X du à des mutations d'ABCB7 (Allikmets *et al.* 1999) et des cholestases intra-hépatiques provoquées par des mutations d'ABCB4 (de Vree *et al.* 1998) et ABCB11 (Strautnieks *et al.* 1998).

La sous-famille ABCC

La sous-famille ABCC contient 12 transporteurs entiers qui ont des fonctions variées dont essentiellement le transport d'ions, efflux de cytotoxiques et de nucléosides.

ABCC1 est l'un des trois principaux transporteurs responsables d'efflux de cytotoxiques. ABCC1 est le principal transporteur de conjugués du glutathion. Ce transporteur a été identifié dans un carcinome de poumon résistant qui ne surexprimait pas ABCB1 (Cole *et al.* 1992). La présence d'ABCC1 confère un large spectre de résistance aux cytotoxiques (Kuwano *et al.* 1999).

ABCC2 est un ABC exprimé notamment dans les hépatocytes et qui transporte des anions organiques du foie vers la bile (Chandra and Brouwer 2004). ABCC3 peut transporter des composés anioniques conjugués au glutathion (Borst *et al.* 2007). ABCC4 et ABCC5 sont des transporteurs de nucléotides cycliques et d'analogues de nucléotides (Ritter *et al.* 2005), mais leur fonction physiologique reste encore à élucider.

Deux ABCC qui n'ont pas de fonction de transport connue, sont des régulateurs de canaux potassium : ABCC8 (SUR1) et ABCC9 (SUR2) (Bryan *et al.* 2007).

Les trois derniers membres de la famille ABCC à avoir été identifiés sont ABCC10, ABCC11 et ABCC12. ABCC10 et ABCC11 sont des pompes d'anions lipophiles qui confèreraient une résistance aux agents chimiothérapeutiques (Kruh *et al.* 2007). Les caractéristiques fonctionnelles d'ABCC12 sont actuellement inconnues.

ABCC13, ne semble pas coder pour un transporteur ABC fonctionnel (Yabuuchi *et al.* 2002; Annilo and Dean 2004).

Plusieurs transporteurs de la sous-famille C ont été associés à des maladies génétiques humaines. Une des protéines ABCC les plus connues est ABCC7 plus connue sous le nom de CFTR. Ce transporteur d'ion chlorure est le gène muté responsable de la mucoviscidose chez l'homme (Riordan *et al.* 1989). ABCC6 est associé au pseudoxanthome élastique (Bergen *et al.* 2007). Enfin des mutations d'ABCC2 sont responsables du Syndrome de Dubin-Johnson (Wada *et al.* 1998).

La sous-famille ABCD

Les transporteurs de la sous-famille ABCD sont des hémi-transporteurs péroxisomaux. Aucun rôle fonctionnel n'a été établi définitivement. Chez l'homme, quatre ABCD ont été identifiés. ABCD1 a été impliqué dans le transport d'esters de coenzymes A et d'acides gras à très longue chaîne. Des mutations dans le gène ABCD1 sont responsables d'adrénoleucodystrophie chez l'homme (Mosser *et al.* 1993).

Les sous-familles ABCE et ABCF

Les sous-familles ABCE et ABCF codent pour des protéines dépourvues de domaines transmembranaires. Un seul membre constitue la sous-famille E : ABCE1 qui est un inhibiteur de la ribonucléase RNaseL (Bisbal *et al.* 1995) et qui a été récemment décrit comme essentiel pour l'assemblage de la capsid du virus VIH (Zimmerman *et al.* 2002) et plus récemment comme un intervenant dans l'initiation de la traduction (Chen *et al.* 2006). Trois ABC constituent la sous-famille F. Aucune fonction n'a été associée à ces transporteurs. Cependant, l'expression d'ABCF1 est induite par le TNF, et une surexpression d'ABCF2 suite à un traitement de chimiothérapie a été observée chez des patients (L'Esperance *et al.* 2006).

La sous-famille ABCG

La sous-famille G (ABCG) se compose de cinq membres : ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, et ABCG8 chez l'homme. Les membres cette sous-famille contiennent un domaine NBD suivi de six domaines transmembranaires, et sont donc des hémis-transporteurs. Ces transporteurs fonctionnent en homodimère (ABCG1, ABCG2, et ABCG4) ou en hétérodimère (ABCG5 et ABCG8). A l'exception d'ABCG2, ces transporteurs sont impliqués dans le transport de cholestérol (Kusuhara and Sugiyama 2007). ABCG2 est considéré aujourd'hui comme étant un des trois transporteurs principaux responsables de la résistance multiple aux drogues. En outre, ABCG2 est responsable du phénotype de « side population » des cellules souches. Il possède une large spécificité de substrats xénobiotiques (Staud and Pavek 2005).

Des mutations causant une perte de fonction d'ABCG5 ou d'ABCG8 sont associées aux sitostérolémies caractérisées par l'accumulation de stérols.

Les tableaux représentés ci-après résument les spécificités de substrats cytotoxiques (Tableau 3) et les fonctions actuellement associées aux transporteurs ABC (Tableau 4).

Gènes	Substrats
ABCA2	Estramustine ; mitoxantrone
ABCB1	Anthracyclines, vinca alcaloïdes, taxanes, etoposide, teniposide, imatinib, irinotecan, SN-38, bisantrène, colchicine, méthotrexate, mitoxantrone, saquinivir, actinomycine D
ABCB4	Daunorubicine, doxorubicine, vincristine, etoposide, mitoxantrone
ABCB5	Doxorubicine, camptothécine, 10-OH camptothécine, and 5FU
ABCB11	Paclitaxel
ABCC1	Anthracyclines, vinca alcaloïdes, méthotrexate, agent antinéoplasique antifolate, etoposide, imatinib, irinotecan, SN-38, arsenite, mitoxantrone, saquinivir
ABCC2	Vinca alcaloïdes, cisplatine, etoposide, doxorubicine, épirubicine, méthotrexate, taxanes, irinotecan, SN-38, topotecan, arsenite, mitoxantrone, saquinivir
ABCC3	Etoposide, teniposide, méthotrexate
ABCC4	6-mercaptopurine, 6-thioguanine, irinotecan, SN-38, topotecan, AZT, méthotrexate, PMEA
ABCC5	6-mercaptopurine, 6-thioguanine, 5-FU, cisplatine, méthotrexate, PMEA, AZT
ABCC6	Etoposide, doxorubicine, daunorubicine, teniposide, cisplatine
ABCC10	Taxanes, vinca-alcaloïdes
ABCC11	6-mercaptopurine, 5-FU, PMEA
ABCG2	Mitoxantrone, camptothécine, anthracycline, étoposide, teniposide imatinib, flavopiridol, bisantrène, méthotrexate, AZT

Tableau 3 : transporteurs ABC et cytotoxiques transportés (Gillet *et al.* 2007).

Gènes	Fonctions
ABCA1	Efflux de cholestérol
ABCA2	Résistance à des cytotoxiques, rôle dans le métabolisme lipidique des macrophages et le développement neural, transport de LDL
ABCA3	Sécrétion de surfactant
ABCA4	Efflux de N-Retinyldiène-PE
ABCA5	Inconnu / Importance dans cardiomyocytes and cellules folliculaires
ABCA6	Transport de lipides dans les macrophages?
ABCA7	Impliqué dans la génération d'HDL dérivés d'apolipoprotéines
ABCA8	Fonction inconnue
ABCA9	Différenciation monocytaire et homéostasie lipidique des macrophages
ABCA10	homéostasie lipidique des macrophages ?
ABCA12	Métabolisme des lipides
ABCA13	Gène candidat pour syndrome de Shwachman-Diamond et certains cancers
ABCB1	résistance aux drogues / protection contre les xénobiotiques hydrophobes
ABCB2	Transport de peptides
ABCB3	Transport de peptides
ABCB4	Transport de phosphatidyl choline
ABCB5	Résistance aux cytotoxiques, régulateur du potentiel de membrane
ABCB6	transport et biosynthèse de l'hème
ABCB7	transport et biosynthèse de l'hème / essentiel pour l'hématopoïèse
ABCB8	Fonction inconnue. Transport de phospholipides, hème, peptides ?
ABCB9	Transport de peptides
ABCB10	Biosynthèse de l'hème
ABCB11	Transport de sels biliaire
ABCC1	Résistance aux drogues / Transporteur d'anion organique
ABCC2	Résistance aux drogues / Transporteur d'anion organique dont sels biliaire
ABCC3	Résistance aux drogues / Transporteur d'anion organique
ABCC4	Résistance aux drogues / Transporteur d'anion organique
ABCC5	Résistance aux drogues / Transporteur d'anion organique
ABCC6	Résistance aux drogues
ABCC7	Canal Chlore
ABCC8	Récepteur aux sulfonylurées régulateur des canaux K(ATP) et de sécrétion d'insuline
ABCC9	Régulateur des canaux K(ATP)
ABCC10	Resistance aux drogues, transport d'E(2)17betaG
ABCC11	Transporteur de E(2)17betaG, sulfates stéroïdes, conjugués du glutathion et acide biliaires
ABCC12	Fonction inconnue / Cible potentielle pour l'immunothérapie dans adénocarcinome
ABCD1	Régulation du transport de VLCFA
ABCD2	Fonction inconnue
ABCD3	Biogenèse du peroxysome
ABCD4	Fonction connue / Rôle dans biogenèse du peroxysome
ABCE1	Inhibition de RNaseL / essentiel à l'assemblage VIH / initiation de la traduction
ABCF1	traduction de l'ARNm ?
ABCF2	traduction de l'ARNm ?
ABCF3	traduction de l'ARNm ?
ABCG1	Efflux de cholestérol et homéostasie lipidique
ABCG2	Résistance aux drogues, Transport de riboflavine (vitamine B2), efflux de l'hème
ABCG4	Efflux de cholestérol
ABCG5	Transport de stérols
ABCG8	Transport de stérols

Tableau 4 : Fonctions connues des transporteurs ABC (Gillet *et al.* 2007).

En gris sont écrites les fonctions supposées.

IV CONTEXTE BIOLOGIQUE ET PROBLEMATIQUE

Depuis la découverte du premier ABC transporteur, ABCB1, en 1976, de nombreuses études se sont intéressées aux transporteurs ABC. Présents dans tous les organismes, ils remplissent de nombreuses fonctions dont le transport d'une grande variété de substrats. Ils jouent d'importants rôles dans l'absorption, la distribution, et l'excrétion des composés pharmacologiques et sont ainsi impliqués dans des maladies héréditaires et dans des physiopathologies graves. Plusieurs d'entre eux sont des protéines capables de transporter des cytotoxiques et peuvent être surexprimés dans les cellules cancéreuses induisant ainsi une résistance aux traitements.

Par conséquent, les transporteurs ABC sont des cibles prometteuses pour le traitement des maladies dans lesquelles ils sont impliqués.

Cependant, bien que de multiples études soient consacrées à ces transporteurs, de nombreux points restent à préciser. En effet, alors que la surexpression de certains transporteurs a été associée à la multirésistance aux drogues, on ignore encore si d'autres membres sont également surexprimés et pourraient participer à ces phénotypes de résistance. De nombreux modèles de lignées cancéreuses résistantes, sélectionnées par des cytotoxiques, peuvent être utilisés pour étudier les mécanismes de résistance. Cependant, la cartographie complète du profil d'expression de la famille des transporteurs ABC, activés suite à l'induction de cette résistance, n'est pas clairement établie. Une meilleure connaissance des profils d'expression des transporteurs ABC, ainsi que d'autres gènes impliqués dans la résistance, devrait permettre d'améliorer la thérapie clinique de certains patients.

Ces transporteurs étant impliqués dans diverses maladies génétiques, la détermination des profils d'expression des transporteurs ABC dans différents tissus, dans des lignées, ou en clinique sur des biopsies issues de cancers, ouvrent de nouvelles voies d'investigation. L'analyse de l'expression de transporteurs ABC dans des applications cliniques reste encore fortement à développer. Alors qu'ABCB1 et ABCC1 sont couramment testés en clinique, la participation potentielle d'autres transporteurs ABC n'est que rarement testée et reste un champ d'investigation de recherche.

Le besoin d'informations précises sur leur spécificité tissulaire et leur fonction biologique souligne la nécessité d'utiliser une méthode sensible, rapide et précise pour la quantification de l'expression des transporteurs ABC. Une recherche systématique de l'expression des transporteurs ABC dans des tissus humains est ainsi justifiée. Traditionnellement, la localisation tissulaire et les variations d'expressions de gènes après stimulation sont mesurées par des analyses de Northern blot, dot-blot, ou hybridation *in situ*. Bien que ces méthodes soient largement acceptées elles nécessitent de grandes quantités d'ARN et ne sont pas adaptées à l'analyse rapide de nombreux gènes sur un grand nombre d'échantillons.

Le développement de la génomique a conduit à l'émergence de nouvelles technologies, qui permettent d'appréhender simultanément l'expression de l'ensemble des gènes de l'organisme par l'étude de son transcriptome sur puce à

ADN. L'utilisation de puces à ADN permet de sélectionner des marqueurs parmi un très grand nombre de gènes. L'utilisation de puce à ADN est très utile pour découvrir de nouveaux marqueurs. Cependant, cette technique ne permet pas d'avoir une quantification précise du niveau d'expression des gènes.

La PCR-quantitative par sa précision, sa rapidité et sa reproductibilité peut compléter cette technique mais aussi peut être parfaitement adaptée à des problématiques concernant un nombre plus limité de gènes à étudier. La PCR quantitative est une technique très sensible qui permet de quantifier jusqu'à une copie de transcrit par réaction de PCR.

Ce manuscrit présente les résultats obtenus par PCR quantitative qui nous ont permis d'établir une cartographie de l'expression de l'ensemble des transporteurs ABC sur une variété d'échantillons humains et murins.

Après avoir, dans une première partie mesuré l'expression des transporteurs ABC suite à un traitement par un cytotoxique, la colchicine, *in vitro* sur des lignées cellulaires, mon travail de thèse s'est intéressé à l'incidence de ces traitements *in vivo* chez la souris.

Nous avons ensuite étendu cette cartographie ABC à mesure de l'expression de cette famille de gènes au cours du développement hépatique (aux stades : fœtal, nouveau né et adulte).

L'importance fonctionnelle des transporteurs ABC a ensuite été étudiée sur des cellules souches humaines en différenciation.

Nous nous sommes intéressés au pattern d'expression des transporteurs ABC dans des lignées cellulaires résistantes à des cytotoxiques, utilisées couramment en laboratoire pour des tests de cytotoxicité.

Enfin, dans le but d'étudier l'importance de cette famille de protéines pour la réponse aux traitements de chimiothérapie anticancéreuse chez l'homme, nous avons étudié les corrélations entre le profil d'expression de certains transporteurs ABC et les phénotypes de chimiorésistance de patients leucémiques.

VBIBLIOGRAPHIE

- Allikmets, R., W. H. Raskind, A. Hutchinson, N. D. Schueck, M. Dean and D. M. Koeller (1999). "Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A)." Hum Mol Genet **8**(5): 743-9.
- Annilo, T. and M. Dean (2004). "Degeneration of an ATP-binding cassette transporter gene, ABCC13, in different mammalian lineages." Genomics **84**(1): 34-46.
- Bergen, A. A., A. S. Plomp, X. Hu, P. T. de Jong and T. G. Gorgels (2007). "ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum." Pflugers Arch **453**(5): 685-91.
- Bisbal, C., C. Martinand, M. Silhol, B. Lebleu and T. Salehzada (1995). "Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway." J Biol Chem **270**(22): 13308-17.
- Boonstra, R., H. Timmer-Bosscha, J. van Echten-Arends, D. M. van der Kolk, A. van den Berg, B. de Jong, *et al.* (2004). "Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation." Br J Cancer **90**(12): 2411-7.
- Borst, P., C. de Wolf and K. van de Wetering (2007). "Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5." Pflugers Arch **453**(5): 661-73.
- Brooks-Wilson, A., M. Marcil, S. M. Clee, L. H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, *et al.* (1999). "Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency." Nat Genet **22**(4): 336-45.
- Bryan, J., A. Munoz, X. Zhang, M. Dufer, G. Drews, P. Krippel-Drews, *et al.* (2007). "ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K⁺ channels." Pflugers Arch **453**(5): 703-18.
- Cavadini, P., G. Biasiotto, M. Poli, S. Levi, R. Verardi, I. Zanella, *et al.* (2007). "RNA silencing of the mitochondrial ABCB7 transporter in HeLa cells causes an iron-deficient phenotype with mitochondrial iron overload." Blood **109**(8): 3552-9.
- Chandra, P. and K. L. Brouwer (2004). "The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts." Pharm Res **21**(5): 719-35.
- Chen, Z. J., B. Vulevic, K. E. Ile, A. Soulika, W. Davis, Jr., P. B. Reiner, *et al.* (2004). "Association of ABCA2 expression with determinants of Alzheimer's disease." Faseb J **18**(10): 1129-31.
- Chen, Z. Q., J. Dong, A. Ishimura, I. Daar, A. G. Hinnebusch and M. Dean (2006). "The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors." J Biol Chem **281**(11): 7452-7.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, *et al.* (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-4.
- de Vree, J. M., E. Jacquemin, E. Sturm, D. Cresteil, P. J. Bosma, J. Aten, *et al.* (1998). "Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 282-7.
- Dean, M. and T. Annilo (2005). "Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 123-42.
- Dean, M., A. Rzhetsky and R. Allikmets (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-66.
- Gillet, J. P., T. Efferth and J. Remacle (2007). "Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes." Biochim Biophys Acta **1775**(2): 237-62.
- Graff, C. L. and G. M. Pollack (2004). "Drug transport at the blood-brain barrier and the choroid plexus." Curr Drug Metab **5**(1): 95-108.
- Herget, M. and R. Tampe (2007). "Intracellular peptide transporters in human--compartmentalization of the "peptidome"." Pflugers Arch **453**(5): 591-600.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.
- Hirschmann-Jax, C., A. E. Foster, G. G. Wulf, J. G. Nuchtern, T. W. Jax, U. Gobel, *et al.* (2004). "A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14228-33.

- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." *Biochim Biophys Acta* **455**(1): 152-62.
- Kartner, N., D. Evernden-Porelle, G. Bradley and V. Ling (1985). "Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies." *Nature* **316**(6031): 820-3.
- Kelsell, D. P., E. E. Norgett, H. Unsworth, M. T. Teh, T. Cullup, C. A. Mein, *et al.* (2005). "Mutations in ABCA12 underlie the severe congenital skin disease harlequin ichthyosis." *Am J Hum Genet* **76**(5): 794-803.
- Koch, J., R. Guntrum, S. Heintke, C. Kyritsis and R. Tampe (2004). "Functional dissection of the transmembrane domains of the transporter associated with antigen processing (TAP)." *J Biol Chem* **279**(11): 10142-7.
- Krishnamurthy, P. C., G. Du, Y. Fukuda, D. Sun, J. Sampath, K. E. Mercer, *et al.* (2006). "Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter." *Nature* **443**(7111): 586-9.
- Kruh, G. D., Y. Guo, E. Hopper-Borge, M. G. Belinsky and Z. S. Chen (2007). "ABCC10, ABCC11, and ABCC12." *Pflugers Arch* **453**(5): 675-84.
- Kusuhara, H. and Y. Sugiyama (2007). "ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family)." *Pflugers Arch* **453**(5): 735-44.
- Kuwano, M., S. Toh, T. Uchiumi, H. Takano, K. Kohno and M. Wada (1999). "Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance." *Anticancer Drug Des* **14**(2): 123-31.
- L'Esperance, S., I. Popa, M. Bachvarova, M. Plante, N. Patten, L. Wu, *et al.* (2006). "Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors." *Int J Oncol* **29**(1): 5-24.
- Laing, N. M., M. G. Belinsky, G. D. Kruh, D. W. Bell, J. T. Boyd, L. Barone, *et al.* (1998). "Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells." *Cancer Res* **58**(7): 1332-7.
- Mace, S., E. Cousin, S. Ricard, E. Genin, E. Spanakis, C. Lafargue-Soubigou, *et al.* (2005). "ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* **18**(1): 119-25.
- Mosser, J., A. M. Douar, C. O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, *et al.* (1993). "Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters." *Nature* **361**(6414): 726-30.
- Riordan, J. R., K. Deuchars, N. Kartner, N. Alon, J. Trent and V. Ling (1985). "Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines." *Nature* **316**(6031): 817-9.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, *et al.* (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." *Science* **245**(4922): 1066-73.
- Ritter, C. A., G. Jedlitschky, H. Meyer zu Schwabedissen, M. Grube, K. Kock and H. K. Kroemer (2005). "Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5)." *Drug Metab Rev* **37**(1): 253-78.
- Roninson, I. B., J. E. Chin, K. G. Choi, P. Gros, D. E. Housman, A. Fojo, *et al.* (1986). "Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(12): 4538-42.
- Rust, S., M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J. C. Piette, *et al.* (1999). "Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1." *Nat Genet* **22**(4): 352-5.
- Schuijjer, M. M. and T. Langmann (2005). "Molecular diagnosis of ATP-binding cassette transporter-related diseases." *Expert Rev Mol Diagn* **5**(5): 755-67.
- Shulenin, S., L. M. Noguee, T. Annilo, S. E. Wert, J. A. Whitsett and M. Dean (2004). "ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency." *N Engl J Med* **350**(13): 1296-303.
- Staud, F. and P. Pavlek (2005). "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(4): 720-5.
- Strautnieks, S. S., L. N. Bull, A. S. Knisely, S. A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, *et al.* (1998). "A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis." *Nat Genet* **20**(3): 233-8.
- Szakacs, G., J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe and M. M. Gottesman (2006). "Targeting multidrug resistance in cancer." *Nat Rev Drug Discov* **5**(3): 219-34.

- Wada, M., S. Toh, K. Taniguchi, T. Nakamura, T. Uchiumi, K. Kohno, *et al.* (1998). "Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome." Hum Mol Genet **7**(2): 203-7.
- Yabuuchi, H., S. Takayanagi, K. Yoshinaga, N. Taniguchi, H. Aburatani and T. Ishikawa (2002). "ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver." Biochem Biophys Res Commun **299**(3): 410-7.
- Zhang, F., W. Zhang, L. Liu, C. L. Fisher, D. Hui, S. Childs, *et al.* (2000). "Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes." J Biol Chem **275**(30): 23287-94.
- Zimmerman, C., K. C. Klein, P. K. Kiser, A. R. Singh, B. L. Firestein, S. C. Riba, *et al.* (2002). "Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids." Nature **415**(6867): 88-92.

Chapitre II

La PCR quantitative

Chapitre II La PCR quantitative

I PRINCIPE DE PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR en anglais pour Polymerase Chain Reaction), est une méthode utilisée en biologie moléculaire permettant d'amplifier considérablement le nombre de copies d'une séquence spécifique d'ADN. Cette technique est basée sur une répétition de plusieurs dizaines de cycles de transition de température, sous l'action d'une ADN polymérase thermostable. Chaque cycle comporte 3 étapes (Figure 4) : la matrice d'ADN est tout d'abord dénaturée par la chaleur. Le mélange réactionnel est refroidi jusqu'à une température permettant l'hybridation d'amorces au niveau de leur séquence cible.

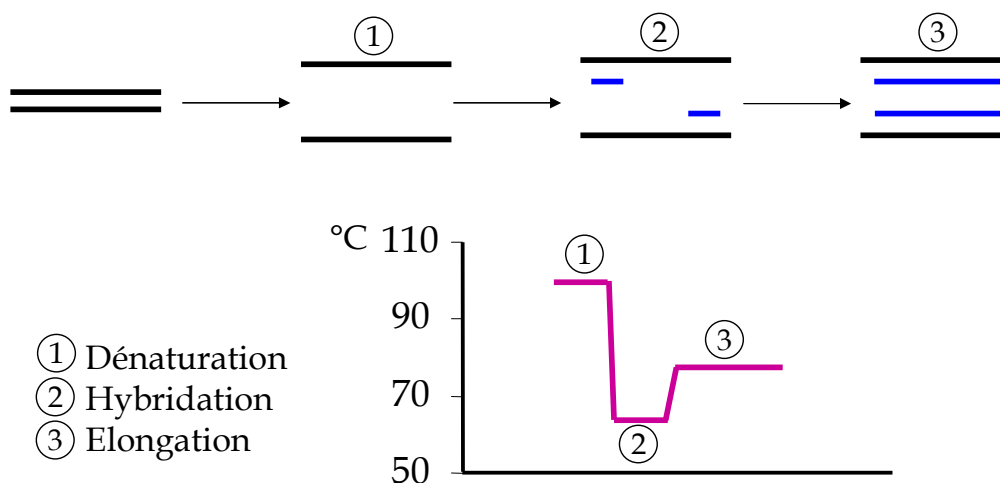


Figure 4 : Etapes de la réaction de PCR

Phase de dénaturation (1 sur le schéma)

Cette étape (généralement à 95°C) permet de déshybrider les ADN, et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (2 sur le schéma)

Cette étape (généralement à 50-60°C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrices grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable.

Phase d'élongation (3 sur le schéma)

Cette étape (généralement à 72°C) permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présent dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon.

L'ADN polymérase allonge ensuite les amorces par l'adjonction de nouveaux nucléotides complémentaires de la matrice d'ADN. Comme les fragments d'ADN synthétisés au cours d'un cycle servent de matrice au cycle suivant, la quantité du fragment d'ADN ciblé s'accroît exponentiellement au cours de la PCR (Figure 5).

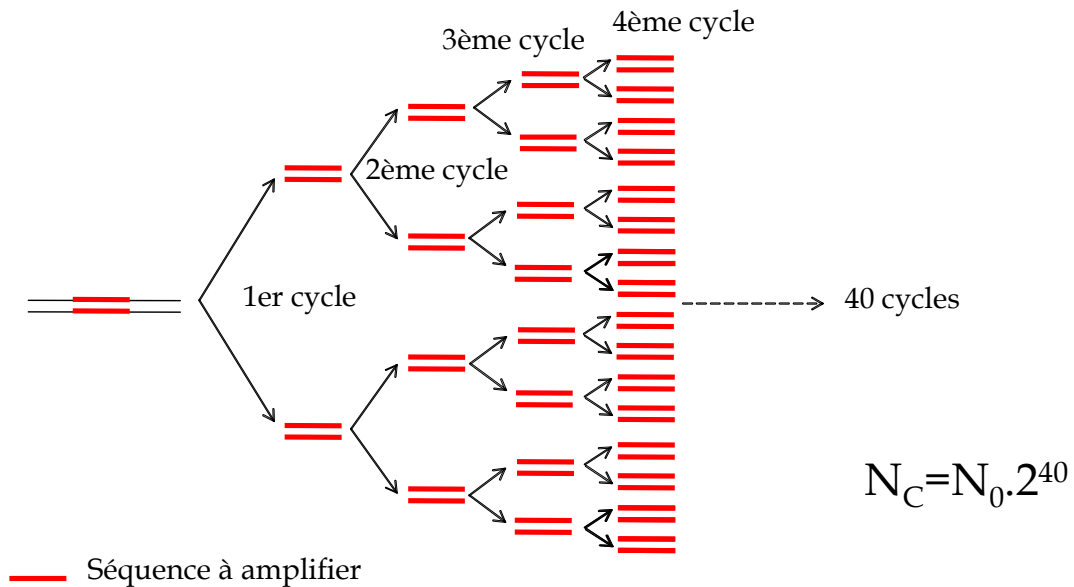


Figure 5 : La PCR, une amplification exponentielle.

Cette réaction PCR permet à partir d'un échantillon présent en très faible quantité au départ d'amplifier de façon considérable cette région d'intérêt. Ainsi en débutant la PCR par une copie, après 40 cycles, on obtiendra en théorie en fin de réaction 2^{40} copies de cette séquence (soit 10^{12} copies).

Simple, rapide et fiable, la PCR donne de très bons résultats qualitatifs. Ses applications sont nombreuses : clonage moléculaire, mutagenèse dirigée, criblage de banques d'ADN génomique et d'ADNc, analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes mais aussi analyse moléculaire au niveau d'une cellule unique, diagnostic et suivi de maladies (cancers, infections et parasitoses)...

1 Historique

La PCR est une technologie qui a bouleversé la biologie moléculaire et s'est implantée très rapidement dans les laboratoires. Cette technique a largement évolué depuis ses débuts.

C'est dans les années 1985-87 que des publications décrivent pour la première fois la réaction de PCR (Saiki *et al.* 1985; Mullis *et al.* 1986; Mullis and Faloona 1987). A l'origine, la réaction était catalysée par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'E. coli. Par la suite, le protocole original a été amélioré (Saiki *et al.* 1988) en remplaçant cette ADN polymérase thermosensible par une ADN polymérase

thermostable, la Taq polymérase (isolée de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*) (Chien *et al.* 1976). Cette innovation permet un bond énorme vers l'automatisation. La généralisation des thermocycleurs (en remplacement de trois bains-marie) a permis de rendre la PCR moins contraignante et plus reproductible. En 1991, la propriété 5' exonucléase de la Taq polymérase a été exploitée pour suivre la réaction d'amplification en utilisant une sonde oligonucléotide marquée (^{32}P) hybridant sur la séquence amplifiée (Holland *et al.* 1991).

En 1992, est décrit le premier dispositif expérimental d'enregistrement en temps réel de l'amplification d'une séquence par PCR (Higuchi *et al.* 1992). Ce système « en temps réel » comprenait l'intercalant bromure d'éthidium (BET) dans chaque mélange réactionnel. Les opérations étaient effectuées à l'aide d'un thermocycleur approprié permettant de stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. La fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD refroidie assistée par ordinateur. Lors du processus d'amplification, l'accumulation d'ADN double brin entraînait une augmentation de la fluorescence. En restituant graphiquement le rapport entre l'émission de lumière fluorescente et le nombre de cycles, le système générait des graphiques d'amplification. En 1996 (Heid *et al.* 1996) un article présente une nouvelle méthode permettant de mesurer l'accumulation du produit PCR via une sonde fluorescente doublement marquée : la sonde TaqMan.

2 Une application : La PCR quantitative

Si la technique de PCR s'est imposée dans les laboratoires, la PCR en temps réel a dû attendre la mise sur le marché d'un certain nombre d'innovations technologiques avant de se développer. Elle est encore considérée comme une méthodologie nouvelle. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent.

Elle permet de mesurer quantitativement l'expression des gènes. Le nom le plus communément utilisé est la qPCR pour « quantitative PCR ».

Pour appliquer la PCR à l'étude de l'expression des gènes, une étape supplémentaire, précédant l'étape d'amplification, est nécessaire : il s'agit de convertir des ARNm en ADN complémentaires ou ADNc. Cette étape fait appel à une transcriptase inverse ou RT (Reverse Transcriptase). La PCR se fait ensuite en présence d'un fluorophore et la cinétique d'accumulation de la fluorescence qui traduit la quantité initiale d'ARN messagers est mesurée. L'évolution de cette cinétique peut être représentée par une courbe dont l'allure est celle d'une sigmoïde (Figure 6).

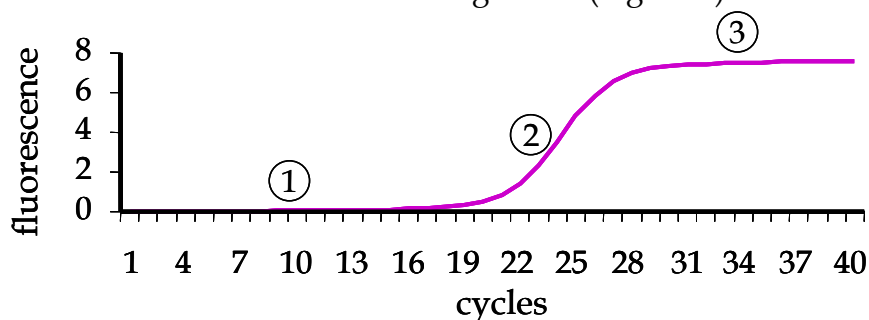


Figure 6 : Augmentation de la fluorescence au cours du temps.

Cette courbe peut être divisée en 3 phases. Pendant la première phase la fluorescence ne se démarque pas du bruit de fond. Puis la visualisation de l'augmentation de la fluorescence passe par une phase exponentielle (deuxième phase) avant de ralentir et atteindre un plateau (dernière phase). Pendant la phase exponentielle, la quantité de produit de PCR obtenue est directement proportionnelle au nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié.

Pendant la phase exponentielle, la quantité d'ADN (N) dépend de la concentration initiale en ADN (N_0) du nombre de cycle (C) et de l'efficacité (E).

$$N_c = N_0 \times E^C$$

La phase en plateau correspond à un ralentissement de l'amplification qui est dû le plus souvent à l'épuisement d'un des différents réactifs de la PCR comme les amorces, une compétition entre l'ADN_c formé et les amorces, et à la formation de pyrophosphate.

La PCR quantitative en temps réel repose sur un nouveau principe de quantification : « on n'observe plus combien mais à quel moment ». Ce moment correspond à un certain nombre de cycles appelé Ct (Cycle seuil ou Threshold Cycle). Ce seuil, déterminé par l'utilisateur après analyse des profils de fluorescence, correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevé pour être au dessus du bruit de fond (Figure 7).

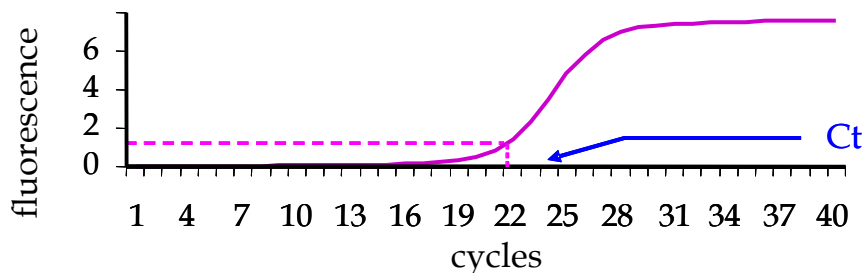


Figure 7 : Détermination du cycle seuil

Plusieurs technologies permettent de mesurer la fluorescence. Voici deux technologies utilisées pendant ma thèse :

2.1 Le SYBR Green.

Suite aux expériences en 1992 de Higuchi et coll., le bromure d'éthidium a été remplacé par un autre agent moins toxique, le SYBR Green I. La molécule SYBR-Green I se fixe dans le petit sillon de l'ADN double brin, et non à l'ADN simple brin. Suite à cette liaison, la fluorescence augmente considérablement. Ainsi, lors d'une PCR en présence de SYBR Green l'augmentation de la quantité d'ADN double brin va générer un signal fluorescent. Grâce à un système d'enregistrement de la fluorescence, la progression de l'amplification peut être suivie à chaque cycle et en temps réel.

Une limitation de ce système est due au fait que son mode de reconnaissance soit non spécifique. Chaque molécule d'ADN double brin présente dans une PCR est quantifiée, y compris donc les produits PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorce. Il convient donc de s'assurer de la spécificité des produits de PCR. Il est conseillé, par exemple, de faire migrer sur gel les produits de PCR afin de s'assurer que la taille du fragment amplifié correspond à ce qui est attendu. Il est également possible d'effectuer une analyse de la courbe de fusion. Après l'étape finale de la PCR, la température est élevée lentement permettant au point de fusion la dissociation des produits. Étant donné que chaque ADN double brin possède une température de fusion spécifique, il est possible de quantifier les éléments ayant différentes températures de fusion dans un seul et même mélange réactionnel, et par conséquent de vérifier que l'amplification PCR est bien spécifique d'un seul produit.

2.2 La chimie Taqman

La chimie Taqman fait appel au phénomène d'extinction de la fluorescence (ou quenching). Elle fait intervenir en plus des deux amorces d'oligonucléotides, une sonde d'oligonucléotides spécifique d'une région interne de la séquence à amplifier. Cette sonde, marquée en 5' par un fluorophore « reporter » et en 3' par un autre type de fluorophore « quencher », est appelée sonde Taqman. Le spectre d'émission du « reporter » chevauche le spectre d'excitation du quencher. L'émission du « reporter » est donc éteinte (ou quenchée) par la proximité du « quencher ». Durant la PCR, la sonde s'hybride spécifiquement entre les deux amorces. Lorsque la sonde est intacte, la proximité du colorant « reporter » par rapport au colorant d'extinction de fluorescence entraîne la suppression de la fluorescence du « reporter » essentiellement par transfert d'énergie de type Forster (Förster 1948). L'activité exonucléase 5'->3' de la Taq polymérase (Lie and Petropoulos 1998) dégrade la sonde Taqman, libère ainsi les deux fluorophores (Figure 8). Les deux molécules sont ainsi séparées et l'émission du reporter sera donc augmentée. Cela entraîne un accroissement de la fluorescence au fur et à mesure de l'amplification. L'accumulation de produit PCR est détectée en contrôlant l'augmentation de fluorescence « reporter ». Cette approche permet d'augmenter la spécificité du signal, en effet, la fluorescence émise provient uniquement du produit amplifié.

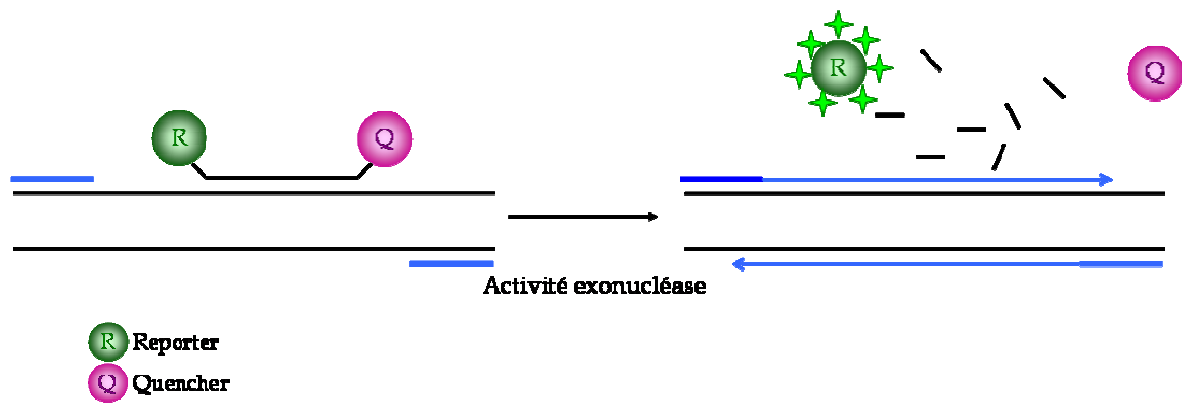


Figure 8 : La chimie Taqman

A gauche : pendant la réaction de PCR les amorces ainsi que la sonde Taqman s'hybrident sur la séquence d'ADN spécifique. La fluorescence du « reporter » est éteinte par la proximité du « quencher ».

A droite : lors de l'élongation du brin complémentaire, la Taq polymérase dégrade la sonde Taqman grâce à son activité exonucléase 5'-3'. Le « reporter » ainsi libéré émet de la fluorescence.

II METHODES UTILISEES AU LABORATOIRE

Nous nous sommes intéressés au pattern d'expression de l'ensemble des transporteurs ABC dans différents tissus ou cellules, sains, malades ou traités. Pour cela nous avons eu plusieurs approches.

Nous avons travaillé au début en PCR quantitative, avec un marqueur fluorescent spécifique de l'ADN double brin (le SYBR Green I). Nous avons ensuite utilisé une technologie de criblage avec une puce à oligonucléotides dédiée aux transporteurs ABC. Enfin nous avons opté pour la technique de PCR quantitative en sonde TaqMan sur un appareil robotisé.

1 PCR SYBR Green

Nous avons tout d'abord utilisé la PCR quantitative en SYBR Green à l'aide du Light cycler de Roche (Roche Molecular Biochemicals).

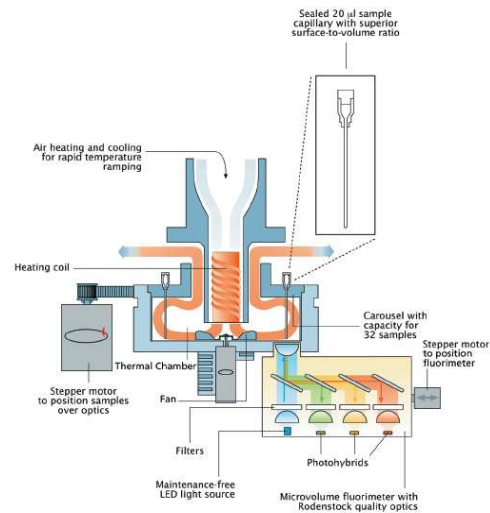
1.1 Description de la technique

Le développement de ce thermocycleur a résulté de la convergence de deux principes qui sont, d'une part, le transfert de chaleur par convection d'air chaud ou froid, et d'autre part, le suivi en « temps réel » de la cinétique complète de l'amplification des ADNc. L'utilisation de tubes capillaires (verre en borosilicate) ayant une grande surface de contact avec le milieu ambiant facilite les échanges thermiques lors de la réaction d'amplification et permet une nette réduction du temps de chaque étape de

l'amplification. Les capillaires se placent dans un carrousel pouvant contenir jusqu'à 32 capillaires (Figure 9).



Figure 9 : Le light Cycler (Roche Diagno



Chaque cycle d'amplification est constitué par une phase de dénaturation, une phase d'hybridation des amorces et une phase d'élongation. A la fin de chaque cycle d'amplification, une lecture spectrofluorométrique est réalisée afin de quantifier avec une grande précision la quantité d'ADNc amplifié et accumulé dans le capillaire. L'ordinateur associé au Light cycler acquiert et traite les données en temps réel. Le traitement des données se fait en traçant l'augmentation de la fluorescence au cours des cycles de PCR. Pour chaque cible un axe parallèle à l'axe des abscisses est tracé et détermine le threshold. Le threshold peut-être déterminé manuellement ou automatiquement par l'appareil Au point d'intersection du threshold et de la courbe d'amplification, la projection de l'axe des ordonnées peut être tracée et va déterminer le Ct ou cycle seuil. Ce cycle sera utilisé afin de comparer la quantité d'ADNc ciblé contenue dans les différents échantillons. Sa conversion en concentration relative en ADNc sera rendue possible par la réalisation préalable d'une gamme d'étalonnage.

1.2 Gamme de dilution et efficacité de la réaction

La réaction d'amplification sur le Light cycler TM a été étalonnée pour chaque gène d'intérêt. Pour faire cette gamme étalon nous avons utilisé un « témoin positif universel » qui correspond à des ADN complémentaires obtenus à partir d'un mélange de différents tissus. Pour un gène donné, la gamme étalon a été réalisée par une série de dilutions dans de l'eau ultra pure, de sorte à obtenir 3 valeurs logarithmiques de concentration. La répartition des points de concentration de la gamme pour chaque gène est choisie de telle sorte que leurs Ct après PCR en temps réel encadrent ceux des échantillons à doser. Une fois la réaction de PCR terminée le logiciel Light cycler trace une droite représentant les Ct de la gamme étalon en fonction du logarithme de leurs concentrations (Figure 10).

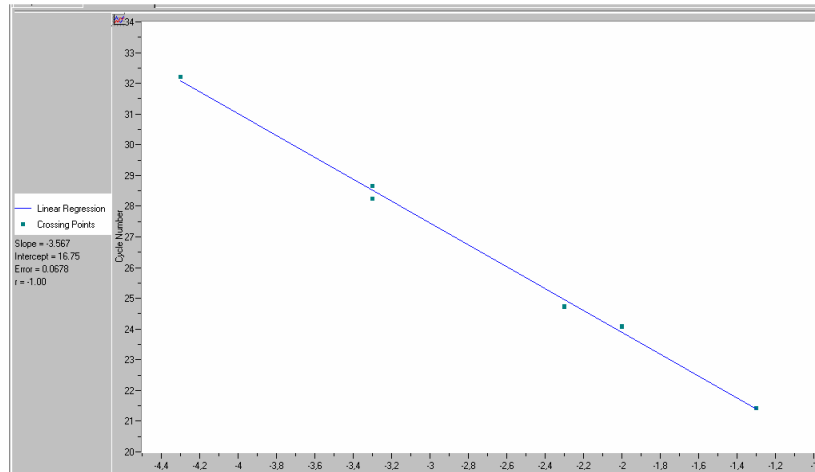


Figure 10 : Exemple de courbe de dilution

A partir de la formule basique de l'amplification exponentielle de PCR :

$$N_C = N_0 \times E^C$$

On peut déduire l'équation : $\log(N_C) = \log(N_0) + \text{Log}(E) \times C$

$$C = \frac{\log(N_C)}{\log(E)} - \frac{1}{\log(E)} \times \log(N_0)$$

où $-1/\log(E)$ correspond à la pente de la droite. Cette pente permet par ailleurs de calculer l'efficacité (E) de la réaction de PCR suivant la formule : $E = 10^{-1/\text{pente}}$

dont il est communément admis qu'elle doit être comprise entre 1,8 et 2. Une efficacité de 2 correspondant à une efficacité parfaite de 100%. Dans ce cas à chaque cycle de PCR la quantité d'amplicon est doublée.

Cette efficacité va nous permettre de déterminer une quantification relative d'un gène d'intérêt, dans un échantillon, par rapport au contrôle en comparaison d'un gène de référence. Le ratio relatif d'expression (R) d'un gène cible est calculé sur la base de son efficacité et de la différence de Ct entre un échantillon et un échantillon contrôle (Pfaffl 2001):

$$R = \frac{E_{\text{gène d'intérêt}}^{(Ct \text{ contrôle} - Ct \text{ échantillon})}}{E_{\text{gène de référence}}^{(Ct \text{ contrôle} - Ct \text{ échantillon})}}$$

$$R = \frac{E_{\text{gène d'intérêt}}^{\Delta Ct \text{ gène d'intérêt}}}{E_{\text{gène de référence}}^{\Delta Ct \text{ gène de référence}}}$$

On considère généralement qu'un gène est sous exprimé quand son ratio d'expression est inférieur à 0,5 et qu'il est surexprimé quand celui-ci est supérieur à 2.

1.3 Dessin des amorces

La réaction de PCR est réalisée en présence d'amorces spécifiques des séquences à amplifier. Ces amorces spécifiques ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

La contamination des échantillons par de l'ADN génomique étant l'une des principales difficultés de cette technique, les amorces doivent donc être choisies en tenant compte de la position des introns. Chaque couple d'amorce a été dessiné sur deux exons différents.

1.4 Spécificité des amorces

L'étude de l'expression d'une famille de gènes par PCR quantitative pose le problème de discrimination des différents membres de la famille, dont les séquences sont parfois proches, par des couples d'amorces spécifiques de chaque gène. Certains membres de la famille des ABC Transporteurs peuvent avoir de fortes homologies de séquences nucléotidiques. La spécificité des amorces a donc été vérifiée sur le site BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Ce site permet d'effectuer des alignements de séquences entre nos amorces et l'ensemble des séquences humaines ou murines répertoriées.

Chaque ADNc double-brin amplifié par PCR possède une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température pour laquelle 50 % de cet ADN double brin contenu dans l'échantillon en fin de réaction de polymérisation est sous forme double brin et 50 % est sous forme simple brin. Le T_m est déterminé par une étape dite de « fusion » réalisée après le dernier cycle de PCR : la température est élevée jusqu'à 95°C, à la vitesse de 20 °C/sec., afin de dénaturer l'ADNc double brin, puis elle est abaissée à la même vitesse jusqu'à une température supérieure de 10 °C à la température d'hybridation, et enfin augmentée très lentement (0,1 °C/sec.) jusqu'à 95°C. La fluorescence est lue en continu durant l'étape de fusion. Le T_m correspond au maxima de la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température (Figure 11). Cette étape permet de s'assurer qu'un seul pic est présent et donc qu'à priori la réaction d'amplification a été spécifique d'un seul ADNc. Une étape supplémentaire de refroidissement des produits d'amplification permet la réhybridation des ADNc simple brin et permet la vérification de l'identité du produit formé après amplification, à la suite de la migration des échantillons sur un gel d'agarose à 1,5 %.

Une fois synthétisés, la spécificité de chaque couple d'amorces est vérifiée expérimentalement par l'observation d'une seule bande sur gel d'agarose, et l'obtention d'un pic unique après réalisation de la courbe de fusion des produits PCR. Pour certains gènes, nous avons dû tester plusieurs sondes avant de trouver un couple d'amorces qui correspondait à ces critères.

Lorsque l'on souhaite analyser l'expression de plusieurs gènes en même temps, il faut que les températures de fusion et que les temps d'élongation des couples d'amorces utilisées soient équivalents. Dans la mesure du possible, nous avons

essayé de garder ces deux paramètres constants. Cependant, la spécificité de nos sondes étant le paramètre le plus important, nous avons dessiné parfois des amplicons de plus grande taille et ayant de ce fait un temps d'élongation plus élevé.

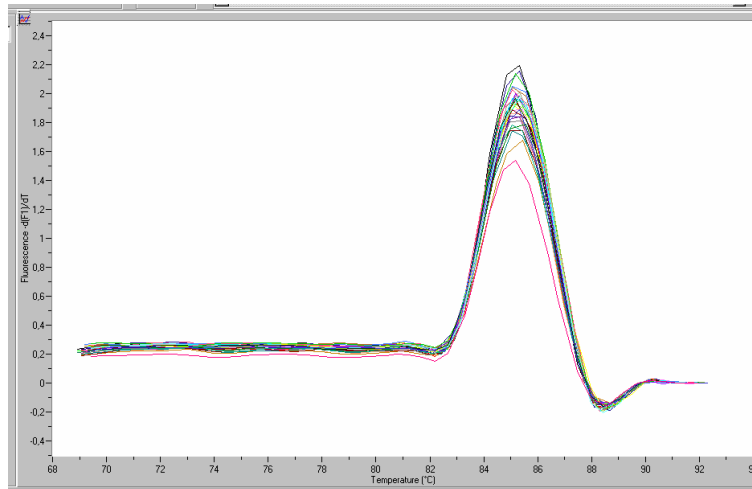


Figure 11 : Exemple de courbe de fusion.

1.5 Inconvénients de la technique SYBR Green-I

La technique de PCR quantitative en utilisant le Light cycler est une technique très sensible. Elle permet d'analyser simultanément jusqu'à 32 échantillons. Cependant, lorsque l'on souhaite analyser plusieurs gènes en même temps, il faut que les températures de fusions et que les temps d'élongation des couples d'amorces soient équivalents. Nous avons tenté de dessiner des couples d'amorces répondant à ces critères, cependant cela n'a pas toujours été possible. De plus, pour un même gène d'intérêt, nous avons du parfois élaborer de nombreux couples d'amorces avant d'obtenir des primers dont la spécificité nous convenait. Mon projet de thèse vise à quantifier l'expression de plus de cent gènes humains et murins, et cette technique n'est pas adaptée à un criblage d'un tel nombre de gènes.

2 Puce à oligonucléotides

Nous avons donc décidé d'utiliser une technique plus adaptée au criblage à haut débit. Nous avons développé une puce à oligonucléotides (50mers, MWG), dédiée à l'analyse de l'expression des Transporteurs ABC humains et murins. Des oligonucléotides amino-modifiés ont été déposés sur des lames de verre de type Epoxy silane.

2.1 Elaboration de la puce : critères de choix d'une sonde

Pour tous les gènes d'intérêt de notre étude (Transporteurs ABC, gènes de référence), nous avons choisi de dessiner 3 sondes différentes répondant à plusieurs critères :

- 1 sonde a été dessinée par la société mwg sans restriction majeure de notre part
- 1 sonde a été choisie sur la base de données MEDIANTE (<http://www.microarray.fr/>).
- 1 sonde a été dessinée par nos soins en respectant nos critères de spécificité et de position sur l'ARNm.

La spécificité :

La spécificité des sondes est primordiale car elle joue directement sur la validité du signal obtenu. Cette spécificité est particulièrement importante à l'intérieur d'une famille et c'est dans les familles de gènes qu'elle est le plus difficile à atteindre. Nous avons choisi avec le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des régions spécifiques des ARNm associés à nos gènes d'intérêts. Nous avons choisi des sondes préférentiellement dans les zones qui nous semblaient les plus spécifiques.

Position de la sonde dans la séquence d'ARNm :

La position de la séquence choisie au niveau de la séquence totale de l'ARNm est primordiale. L'hybridation sur la lame est précédée d'une phase de rétrotranscription en présence de séquences polyT qui s'hybrident sur la séquence polyA située à la fin de l'ARNm. Avec cette méthode, la longueur des brins complémentaires synthétisés n'excède pas 2 000 paires de bases. Nous avons donc décidé d'avoir au moins une sonde à moins de 2-3kb de la séquence polyA.

2.2 Description de notre puce à oligonucléotides

Cette puce est composée de 210 sondes humaines et 231 sondes murines (Figure 12). Parmi ces sondes on trouve :

- l'ensemble des transporteurs ABC humains et murins, chacun représenté par trois sondes différentes
- 12 gènes de référence représentés également par trois sondes différentes
- d'autres gènes (cytochromes, facteurs de transcription...) sont représentés par une seule sonde

Nous avons décidé de répartir les gènes de référence sur la puce et, pour palier au problème de variabilité du dépôt d'ADN et de la non-homogénéité du support, de déposer chaque sonde 3 fois, à des endroits différents.

Nous avons également déposé deux oligonucléotides complémentaires de séquences *Arabidopsis Thaliana* qui servent de contrôles négatifs.

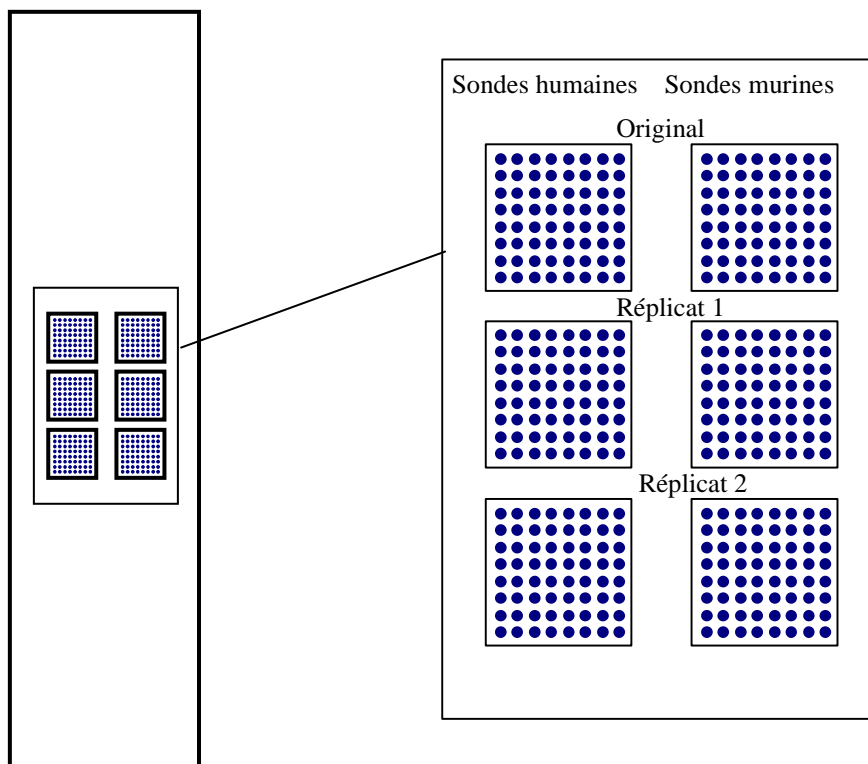


Figure 12 : Puce à ADN dédiée aux transporteurs ABC

2.3 Exemple de résultats obtenus sur la puce à oligonucléotides

Cette puce à oligonucléotides nous a permis d'observer des variations d'expression entre deux échantillons. Pour les sondes humaines, nous avons par exemple observé la surexpression d'un transporteur dans des lignées cellulaires myéloblastiques K562 sélectionnées par la doxorubicine (Figure 13A). Les trois spots qui apparaissent en rouge correspondent aux trois sondes différentes détectant ABCB1. Nous avons également observé des variations d'expression entre le foie et le poumon de souris C57Bl6 (Figure 13B). Sur cette figure on peut observer les variations d'expression de certains transporteurs illustrés par la couleur des spots rouge ou verts sur la lame. Par exemple le transporteur ABCA3 dont les spots sur la puce sont entourés en rouge est plus présent dans le poumon ; alors qu'ABCB11 (entouré en blanc) est plus exprimé dans le foie.

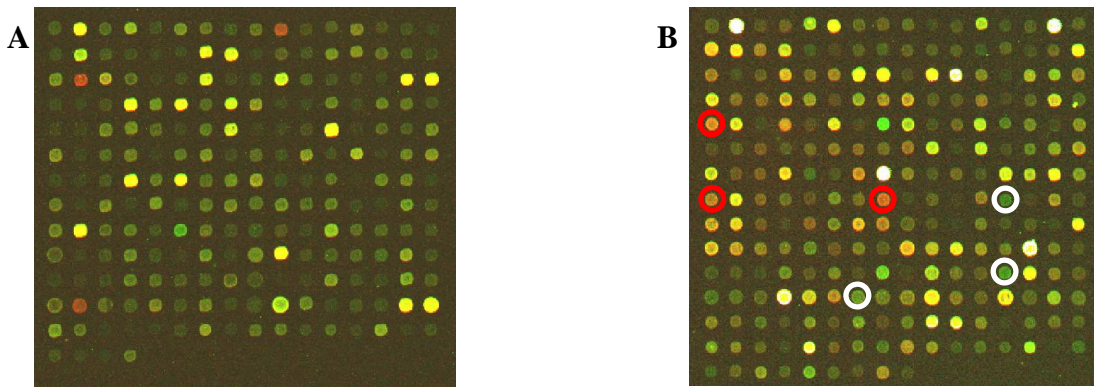


Figure 13 : Résultats obtenus sur la puce à oligonucléotides dédiée aux transporteurs ABC

Images obtenues après dépôt d'ADNc marqués issus de :

A/ lignées K562 sensibles (marquées en vert) et résistantes à la doxorubicine (marquées en rouge).

B/ foie (marqué en vert) et poumon (marqué en rouge) de souris.

2.4 Inconvénients de la technique de puce à oligonucléotides.

Cette technique est beaucoup plus adaptée pour le dosage simultané d'un grand nombre de gènes. Elle permet de tester l'ensemble de nos transporteurs ABC sur deux échantillons en utilisant une lame. Malheureusement, sur ce type de puce dédiée, la normalisation est beaucoup plus difficile que sur des puces pangénomiques ou la normalisation se fait par rapport à l'ensemble des gènes présents sur la lame. Nous avons normalisé nos données grâce à nos douze gènes de références présents sur nos lames. De plus, les ABC transporteurs sont des gènes assez peu exprimés. De nombreux transporteurs ABC ont un faible signal qui se confond avec bruit de fond de la lame. La puce que nous avons utilisée nous donne des résultats beaucoup moins sensibles que ceux obtenus par PCR quantitative. Cette technique nous permet de détecter des variations très importantes entre deux échantillons (par exemple entre une lignée sensible et sa lignée résistante), cependant, les faibles variations ne sont pas détectées. Pour obtenir un signal mesurable pour les transporteurs ABC dont le taux de transcrits est faible une étape d'amplification semble être nécessaire. Néanmoins, nous avons décidé de poursuivre nos expérimentations en utilisant la technologie PCR quantitative en TaqMan dont la sensibilité est nettement supérieure.

3 PCR quantitative TaqMan

Nous avons choisi d'utiliser la chimie TaqMan avec un appareil robotisé : l'ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Nous avons travaillé avec des cartes microfluidiques nous permettant de quantifier simultanément l'expression de tous les transporteurs ABC. Cette technique très sensible et reproductible nous a permis de réaliser jusqu'à 6000 dosages par jour.

3.1 Sondes TaqMan MGB

Les sondes TaqMan utilisées sont particulières : il s'agit de sondes TaqMan dont le quencher est non fluorescent (Figure 14). De plus l'amorce possède un MGB (Minor Groove Binder) qui s'adapte au petit sillon du duplex d'ADN formé après hybridation à l'ADN de cible. Ce MGB stabilise ainsi le duplex.



Figure 14 : Sonde TaqMan MGB

3.2 Cartes microfluidiques ou TLDA

Les cartes microfluidiques ou TLDA pour TaqMan Low Density Array sont des cartes pré-chargées en sondes TaqMan et en amorces. En haut de chaque carte se trouve 8 pores, dans lesquels sont déposés les mélanges réactionnels de PCR. Chaque pore alimente 48 puits de PCR qui contiennent les sondes TaqMan. Le volume de réaction de PCR est de 1 μ l. Les amorces présentes sur la carte sont proches en taille et en température de fusion et sont utilisables dans les mêmes conditions de PCR. Chaque carte permet d'obtenir simultanément 384 courbes d'amplifications (Figure 15).



Figure 15 : ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) et cartes microfluidiques (en haut).

3.3 Vérification de chaque courbe d'amplification et détermination du seuil

Chaque carte génère 384 courbes d'amplification qu'il faut vérifier une à une. Les critères sur lesquels nous nous sommes basés pour valider la qualité de chaque courbe utilisés sont l'allure des courbes et la valeur de variation de la fluorescence : une courbe dont la variation de fluorescence est inférieure à 1 est éliminée.

Le seuil est fixé pour chaque gène de façon automatique ou manuelle. La valeur de fluorescence doit être suffisamment élevée de manière à sortir du bruit de fond, mais suffisamment basse pour ne pas être en dehors de la phase exponentielle. Au niveau du seuil les courbes doivent être parallèles.

Remarque : pour l'analyse des lignées sensibles et résistantes, nous avons voulu estimer le nombre de copies d'ARN messagers par cellules. Pour cette analyse, nous avons donc choisi un seuil fixe pour toutes les sondes. La justification de ce choix sera expliquée au Chapitre VII.

3.4 Reproductibilité de la PCR utilisant les sondes ABC transporteurs

Nous avons voulu tester la reproductibilité de cette technique de PCR. Nous avons utilisé pour cela des résultats obtenus sur près de 9 000 points de PCR qui correspondent à des échantillons testés en triplicata. Pour chaque test effectué en triplicata, nous avons calculé la valeur de Ct moyen. Nous avons ensuite calculé pour chaque point de PCR la valeur absolue de l'écart de son Ct à cette moyenne. La Figure 16 nous montre que 88% de nos PCR ont un écart à la moyenne inférieur à 0,25 ; et que 93% de nos PCR ont un écart à la moyenne inférieur à 0,5. Ces valeurs montrent que les résultats obtenus sont très reproductibles.

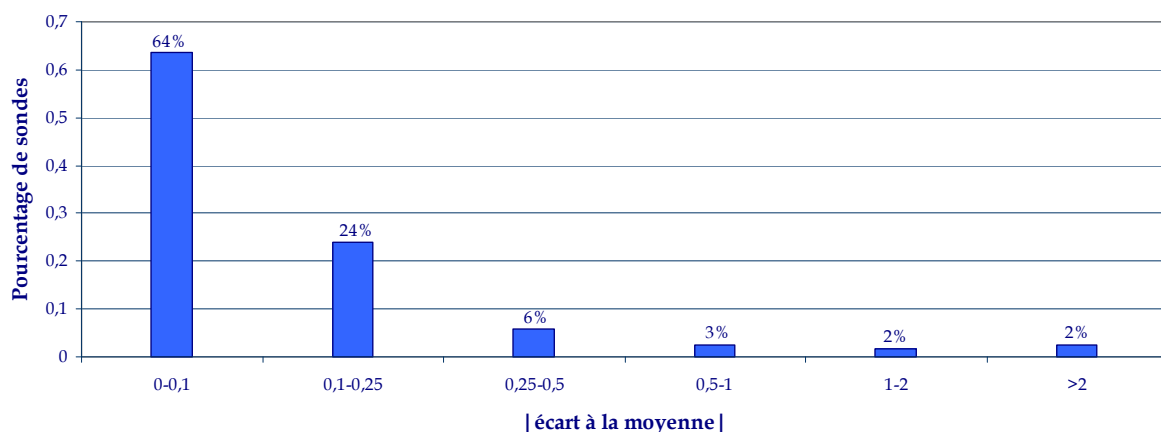


Figure 16 : Répartition des écarts à la moyenne

Nous avons donc tracé l'écart à la moyenne en fonction de la moyenne des triplicata de Ct (Figure 17). Ce graphique nous montre qu'avec des Ct très tardifs les valeurs ne sont plus reproductibles. En effet, concernant des écarts de Ct supérieurs à 1, 92% de ces valeurs ont des Ct moyens supérieurs à 33.

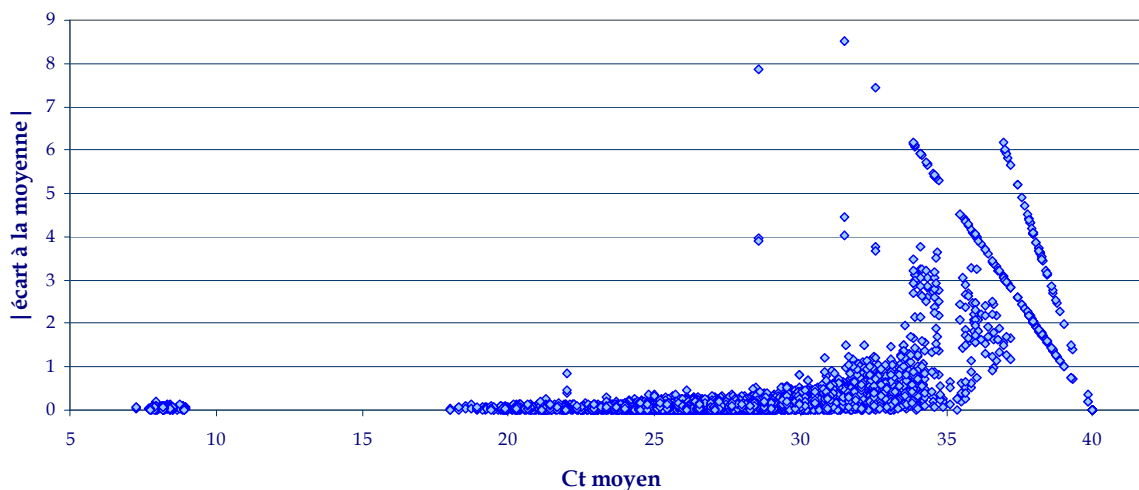


Figure 17 : Ecart à la moyenne des Ct en triplicata en fonction de la moyenne des triplicata de Ct.

Afin de limiter ces écarts, nous avons décidé de descendre la limite de Ct maximum à 35. Lorsque nous fixons le Ct maximum à 35, les écarts restent beaucoup plus faibles (Figure 18). Cette fois-ci, 96% de nos PCR ont un écart à la moyenne inférieur à 0,5. Nous portons une attention particulière aux courbes provenant de Ct compris entre 30 et 35, les écarts étant encore assez importants pour ces valeurs de Ct.

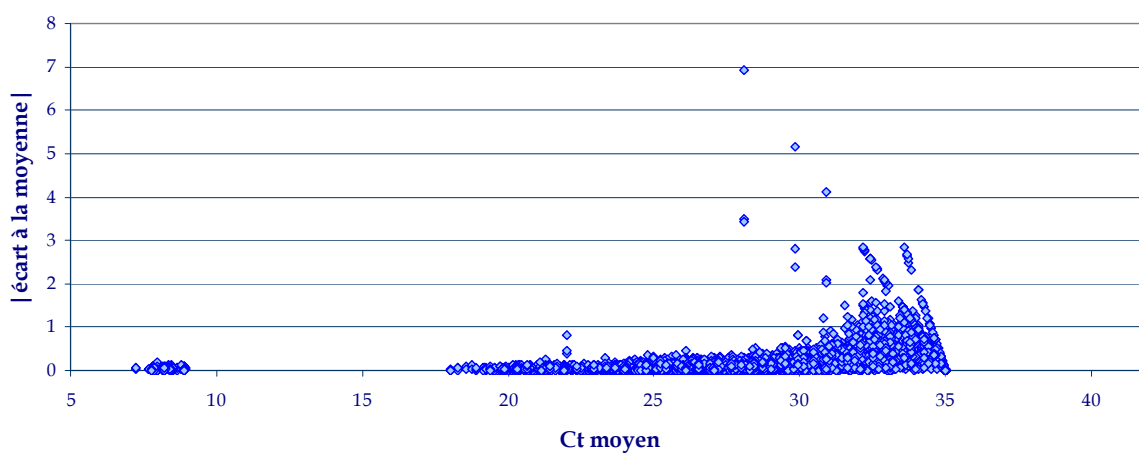


Figure 18 : Ecart à la moyenne de Ct en triplicata en fonction de la moyenne des triplicata de Ct après que le Ct maximum soit fixé à 35.

3.5 Recherche des meilleurs gènes de référence pour la normalisation

La PCR quantitative est actuellement, la technique la plus largement appliquée pour détecter et mesurer des niveaux de transcrits (Bustin 2002). Cependant, cette méthode très sensible doit être effectuée avec rigueur afin d'éviter de biaiser la réponse obtenue.

Cette technique comprend plusieurs étapes (préparation des ARN, transcription inverse, PCR quantitative...) durant lesquelles l'expérimentateur peut induire des variations (Pfaffl 2001; Ramakers *et al.* 2003; Stahlberg *et al.* 2004). Pour corriger les variations dues aux différences de quantités d'ARN, un gène de référence (ou gène de référence, ou gène de maintenance) est amplifié en parallèle de la cible. Ce gène permet de normaliser les résultats de la PCR (Bustin 2002). Les gènes de référence sont des gènes constitutivement exprimés nécessaires pour assurer les fonctions cellulaires basiques. Ils sont employés pour la normalisation des données d'expression de gène (Eisenberg and Levanon 2003). Les gènes de référence couramment utilisés sont la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'actine (ACT), la cyclophiline A (PPIA), et l'ARNr 18S (Warrington *et al.* 2000; Hsiao *et al.* 2001; Eisenberg and Levanon 2003). Ces gènes doivent par définition avoir des niveaux semblables d'ARNm dans tous les échantillons analysés et ils ne doivent pas être régulés par le traitement ou variations expérimentales. Cependant, de nombreuses références classiquement utilisées ne répondent pas toujours aux exigences décrites ci-dessus (Schmittgen and Zakrajsek 2000; Goidin *et al.* 2001; Bustin 2002; Murphy and Polak 2002; de Kok *et al.* 2005). Ces gènes de maintenance, bien que constants dans un modèle expérimental, peuvent varier considérablement dans une condition différente.

Bien que normaliser par un gène de référence constitutivement exprimé soit la méthode la plus courante, il n'y a pas de gène de référence universel constant dans toutes les conditions expérimentales. Il est donc nécessaire de trouver des gènes de référence propres à chaque modèle expérimental.

Vandesompele et collaborateurs ont donc suggéré d'utiliser non pas un mais plusieurs gènes de référence afin d'effectuer une normalisation plus précise (Vandesompele *et al.* 2002). Leur stratégie de normalisation est d'utiliser la moyenne géométrique du niveau d'expression des multiples gènes de référence, en tenant compte du classement des gènes de référence en fonction de leur stabilité d'expression que l'on peut obtenir grâce au logiciel GeNorm.

Une approche similaire utilisant également la moyenne géométrique de gènes de référence a été proposée par l'équipe de Mickael Pfaffl (Pfaffl *et al.* 2004) et deux autres études ont décrit l'utilisation d'un modèle permettant de classer des gènes de référence (Andersen *et al.* 2004; Szabo *et al.* 2004). Andersen et collaborateurs ont conçu le logiciel Normfinder qui classe des gènes de référence en se basant sur l'approche statistique modélisant l'effet linéaire.

Pour doser précisément l'expression des gènes, nous avons utilisé plusieurs gènes de référence que nous avons testés sur nos différentes conditions. Le but est d'utiliser non pas un gène de référence, mais la moyenne géométrique des meilleurs gènes de référence. Cette moyenne ne doit pas inclure les gènes les plus instables dans les conditions testées. Le meilleur nombre de gènes à utiliser pour cette moyenne doit être un compromis entre le nombre de gènes testés et la meilleure précision possible.

Par exemple, nous avons testé douze gènes de référence impliqués dans différentes voies métaboliques, en PCR quantitative pour tous les échantillons cellulaires. Puis nous avons choisi les meilleures références pour nos expériences grâce au logiciel GeNorm. Ce logiciel nous donne une mesure de la stabilité d'expression des gènes de référence sur la base de niveaux d'expression non normalisés. Cette mesure repose sur le principe que le ratio d'expression de deux gènes de référence idéaux est identique dans tous les échantillons. Une variation de ratios d'expression de deux gènes de référence signifie que un (ou deux) de ces gènes n'a pas une expression constante. Une variation entre deux ratios d'expression entraîne alors une baisse de la stabilité d'expression.

Pour cela, pour un même transcrit de gènes de référence, les valeurs brutes de Ct sont comparées pour tous les échantillons. L'échantillon ayant le Ct le plus élevé est soustrait aux autres :

$$\mathbf{\Delta Ct = Ct - Ct_{max}}$$

Ainsi la valeur de Ct maximale est ramenée à 0, les autres valeurs étant négatives. Ensuite chaque point est exprimé en valeur d'expression relative selon l'équation :

$$\mathbf{Expression\ relative = 2^{(-\Delta Ct)}}$$

Ces valeurs d'expression relative sont alors soumises au logiciel GeNorm.

Pour chaque gène de contrôle, le logiciel calcule une variation par paire (« pairwise variation ») avec tous les autres gènes de référence présents.

Soit deux gènes de contrôle j et k. Une matrice A_{jk} de m éléments est calculée correspondant au \log_2 des ratios d'expression a_{ij}/a_{ik} :

$$\mathbf{A_{jk} = \{\log_2(a_{ij}/a_{ik})\}_{i=1 \rightarrow m}}$$

La variation par paire (V) est définie comme la déviation standard des ratios d'expression transformés logarithmiquement :

$$\mathbf{V_{jk} = st.dev(A_{ij})}$$

Cette variation par paire permet de choisir le nombre optimal de gènes de référence à utiliser pour la normalisation. La (Figure 19) a été obtenue après analyse des valeurs d'expression relative de douze gènes de référence avec le logiciel GeNorm. Nous avons obtenu un graphique représentant les niveaux de variation des moyennes de stabilité des gènes de référence. En commençant par les deux gènes les plus stables, et en additionnant séquentiellement le troisième gène, le quatrième etc.... GeNorm conseille d'utiliser une variation inférieure à 0,15. En dessous de cette valeur, l'addition d'un nouveau gène de référence ne paraît pas nécessaire. Dans l'exemple ci-dessous, l'analyse des variations par paire montre que 3 gènes de référence suffisent pour normaliser ces résultats.

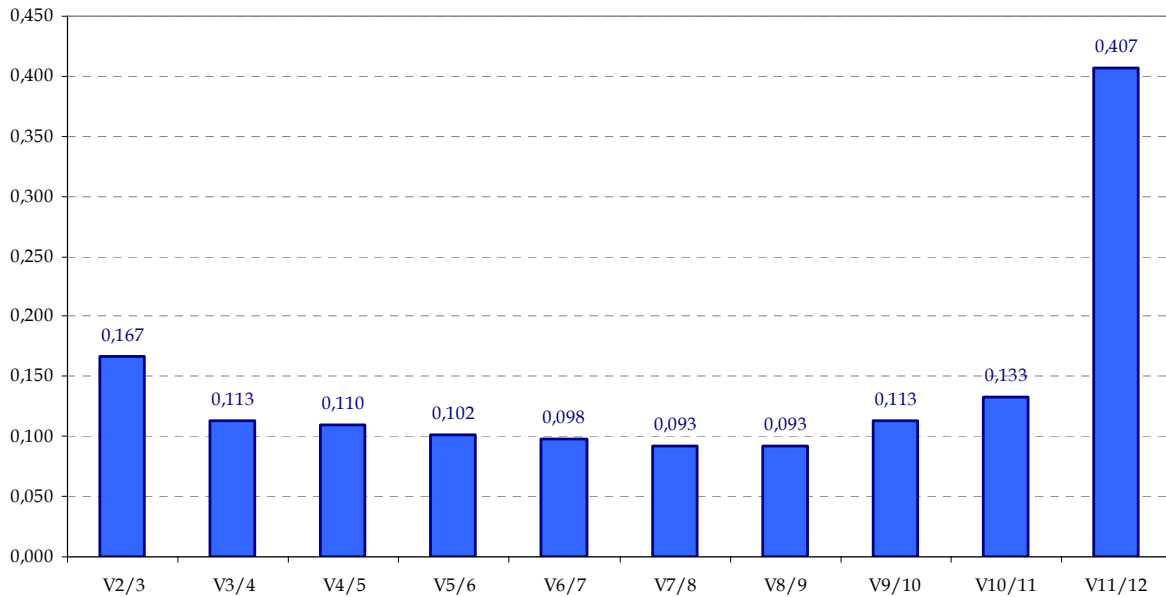


Figure 19 : détermination du nombre optimal de gènes de référence pour la normalisation.

Pour chaque gène de contrôle est calculé une mesure de la stabilité des gènes de contrôle (M) définie comme la moyenne arithmétique des variations par paire entre un gène et les autres.

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1}$$

Ce qui permet de classer ces gènes en fonction de leur moyenne de stabilité d'expression (Figure 20).

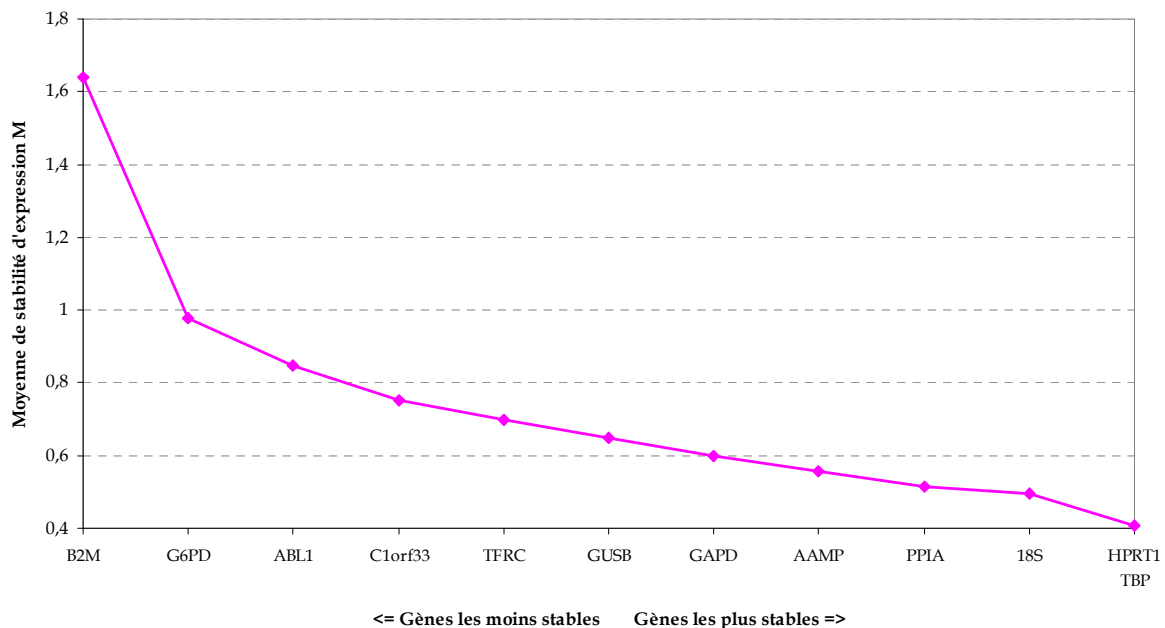


Figure 20 : Moyenne des valeurs de stabilité d'expression des gènes de référence

3.6 Calcul de la quantification relative

Une fois les Ct extraits et les gènes de référence sélectionnés, nous pouvons calculer la quantification relative d'un gène d'intérêt en comparaison avec les gènes de référence choisis. Le ratio relatif d'expression (RQ) d'un échantillon comparé à un échantillon contrôle est calculé de la façon suivante:

$$RQ = \frac{E_{\text{gène d'intérêt}}^{(Ct \text{ contrôle} - Ct \text{ échantillon})}}{E_{\text{gène de référence}}^{(Ct \text{ contrôle} - Ct \text{ échantillon})}}$$

Selon la société Applied Biosystems l'efficacité de la réaction de PCR de l'ensemble de ses sondes est de 2, ce qui permet d'appliquer la formule :

$$RQ = \frac{2^{\Delta Ct \text{ gène d'intérêt}}}{2^{\Delta Ct \text{ gène de référence}}}$$

$$RQ = 2^{(\Delta Ct \text{ gène d'intérêt} - \Delta Ct \text{ gène de référence})}$$

$$RQ = 2^{\Delta \Delta Ct}$$

3.7 Calcul de l'efficacité

Les sondes TaqMan dessinées par la société Applied Biosystems sont garanties pour avoir une efficacité de 90 à 100%. Ces valeurs d'efficacité ont d'abord été déterminées par la société théoriquement. Ensuite, le produit de PCR de chaque sonde a été utilisé comme gamme d'étalonnage. Si nous voulons appliquer la méthode de calcul de $2^{\Delta \Delta Ct}$ nous devons être sûrs que les efficacités d'amplification des gènes de référence et des gènes d'intérêt sont approximativement égales et proche de 2. Nous avons donc voulu vérifier par nous même l'efficacité de ces sondes.

Estimation de l'efficacité par courbe de dilution d'un témoin positif universel

Nous avons tout d'abord utilisé un « témoin positif universel » (Human Universal Reference Total RNA) qui correspond à un mélange d'ARN totaux de différents tissus. Ce mélange d'ARN a été rétrotranscrit en ADN complémentaire. Des dilutions de cet ADN complémentaire ont été déposées sur une carte microfluidique (maximum 5ng d'ADNc par point). Ensuite, pour chaque sonde nous pouvons tracer une droite représentant les valeurs de Ct en fonction du log de la concentration en ADNc. Le coefficient directeur de cette droite nous permet alors de déduire la valeur de l'efficacité pour chaque sonde.

Pour certains transporteurs ABC qui sont peu abondants, nos gammes de dilution sont réduites et peuvent ne pas être suffisantes pour obtenir une bonne courbe d'étalonnage. Aussi nous avons calculé l'efficacité de nos sondes de deux autres façons :

Estimation de l'efficacité par augmentation de la fluorescence absolue

Une approche alternative à la mesure de l'efficacité par gamme étalon est basée sur la linéarisation de la formule basique de l'amplification exponentielle de PCR :

$$N_C = N_0 \times E^C$$

Où N_C est le nombre de copies au cycle C ; N_0 le nombre de copies initiales et E l'efficacité de la PCR. La transformation logarithmique de cette équation donne :

$$\log(N_C) = \log(N_0) + \text{Log}(E) \times C$$

La partie linéaire de cette équation correspond à une droite dont la pente permet de calculer l'efficacité de la PCR selon l'équation :

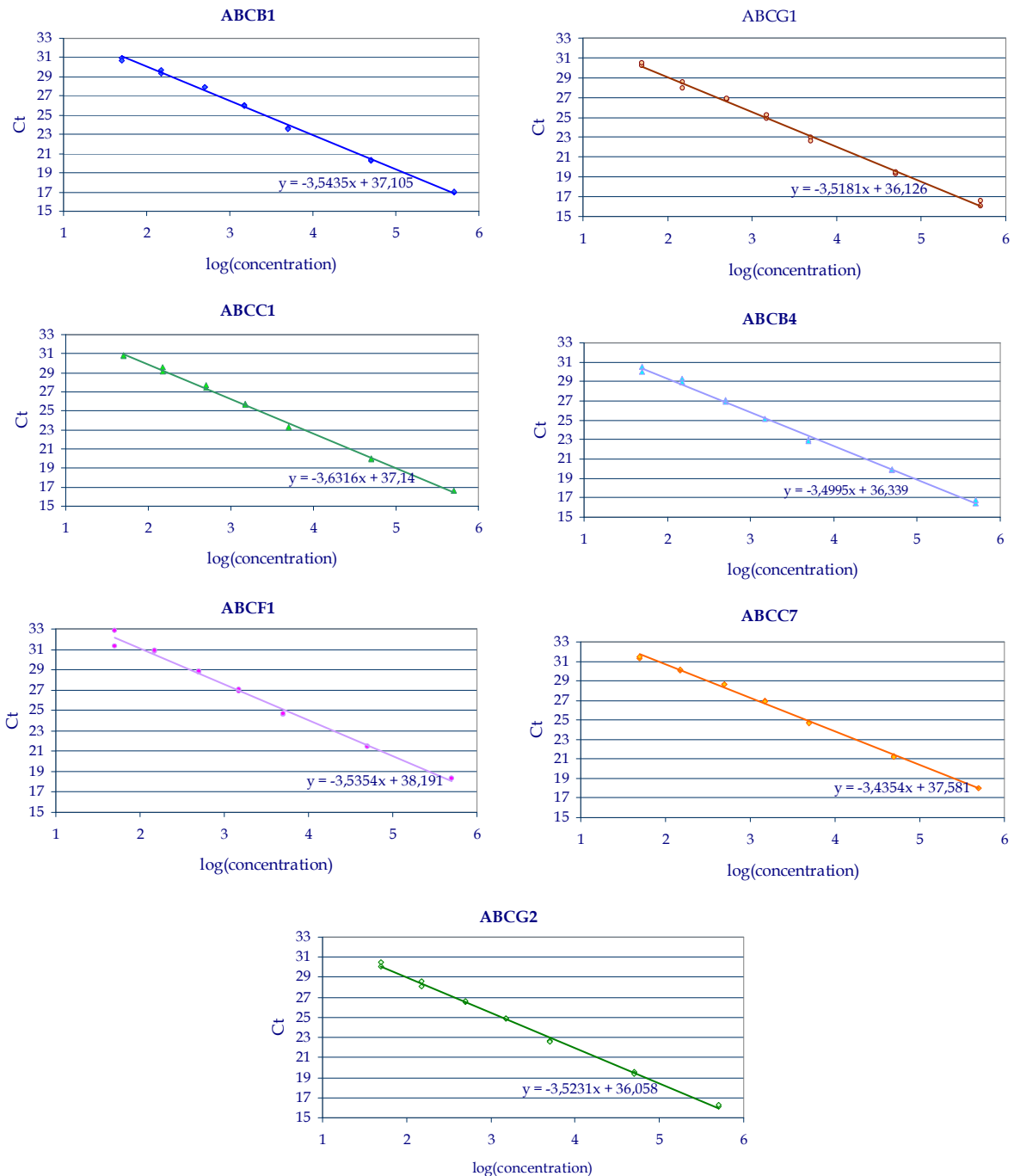
$$E = 10^{\text{pente}}$$

Nous avons utilisé les points de notre gamme étalon que nous avons testé sur un logiciel permettant de calculer l'efficacité de cette manière : LinRegPCR (Ramakers *et al.* 2003). Ce logiciel nous a permis de tester l'ensemble de nos sondes (transporteurs ABC et gènes de référence) et de comparer les valeurs d'efficacité obtenues avec celles des gammes étalons.

Par dilution de plasmide

Le laboratoire disposait de 8 transporteurs ABC (ABCB1, ABCB4, ABCC1, ABCC7, ABCF1, ABCG1, ABCG2) clonés dans des vecteurs plasmidiques. Ces plasmides ont été dosés et mélangés entre eux puis dilués en présence d'un plasmide ne contenant pas de séquences d'ABC. Ce mélange a été dilué plusieurs fois de façon à obtenir une gamme étalon. Cette gamme est testée sur l'ensemble des sondes humaines présentes sur les cartes microfluidiques. Elle comprend 7 dilutions différentes, déposées en duplicata, de 50 ; 150 ; 500 ; 1 500 ; 5 000 ; 50 000 et 500 000 copies de plasmides par points de PCR. Les résultats de C_t obtenus pour ces 8 transporteurs ont permis de tracer un graphique représentant les C_t en fonction du logarithme du nombre de copies de plasmides. Le coefficient directeur de la droite reliant ces points permet de calculer l'efficacité selon la formule :

$$E = 10^{-1/\text{pente}}$$



Grâce à ces trois méthodes, nous avons obtenu l'efficacité réelle des sondes que nous avons utilisées en PCR quantitative. Les valeurs d'efficacité obtenues dans les trois cas sont généralement assez proches. Nous nous sommes tout d'abord intéressé aux valeurs obtenues par la courbe étalon du témoin positif universel. Lorsqu'un point de cette gamme nous paraissait faux, souvent en raison de la faible expression de ce transcrit et donc de Ct tardif, nous avons utilisé l'efficacité obtenue par le calcul d'augmentation de fluorescence absolue. Enfin, pour les 7 transporteurs testés en dilution de plasmide, nous avons vérifié que les valeurs obtenues par dilution de plasmides correspondaient aux valeurs d'efficacité calculées par les autres méthodes. Les tableaux suivants représentent les efficacités réelles mesurées pour les sondes des transporteurs ABC (Tableau 5) et des gènes de référence (Tableau 6).

Gènes d'intérêt	Efficacité exponentielle	Pourcentage d'efficacité
ABCA 1	1,92	96
ABCA 2	2,00	100
ABCA 3	1,99	100
ABCA 4	1,98	99
ABCA 5	1,90	95
ABCA 6	1,96	98
ABCA 7	1,95	98
ABCA 8	1,92	97
ABCA 9	2,00	100
ABCA10	2,00	100
ABCA12	2,00	100
ABCA13	2,00	100
ABCB 1	1,94	97
ABCB 2	2,00	100
ABCB 3	2,00	100
ABCB 4	2,00	100
ABCB 5	1,73	87
ABCB 6	2,00	100
ABCB 7	1,97	98
ABCB 8	1,98	98
ABCB 9	2,00	100
ABCB10	1,98	99
ABCB11	1,93	97
ABCC 1	1,93	97
ABCC 2	2,00	100
ABCC 3	1,99	100
ABCC 4	1,96	98
ABCC 5	1,72	86
ABCC 6	1,90	95
ABCC 7	1,93	96
ABCC 8	1,99	100
ABCC 9	1,92	95
ABCC10	1,86	93
ABCC11	1,86	93
ABCC12	2,00	100
ABCC13	1,70	85
ABCD1	1,78	89
ABCD2	1,76	88
ABCD3	1,95	98
ABCD4	2,00	100
ABCE1	2,00	100
ABCF1	2,00	100
ABCF2	2,00	100
ABCF3	1,98	99
ABCG1	1,96	98
ABCG2	1,92	97
ABCG4	1,89	95
ABCG5	ND	ND
ABCG8	ND	ND

Tableau 5: Valeurs d'efficacité obtenues pour les sondes des transporteurs ABC

Les valeurs sont représentées en efficacité exponentielle, et en pourcentage d'efficacité. La valeur surlignée en bleu représente l'efficacité la plus faible pour les gènes d'intérêt. Pour deux sondes ABCG5 et ABCG8 nous n'avons pu la déterminer en raison de l'absence de ces transcrits dans l'échantillon de référence.

Gènes de référence	Efficacité	Pourcentage d'efficacité
18S	1,92	96
AAMP	1,97	98
B2M	1,86	93
C1orf33	1,95	98
G6PD	1,96	98
GAPD	2,00	100
GUSB	2,00	100
HPRT1	1,93	96
PPIA	2,00	100
TBP	2,00	100
TFRC	2,00	100

Tableau 6 : Valeurs d'efficacité obtenues pour les sondes des gènes de référence

Les valeurs sont représentées en efficacité exponentielle, et en pourcentage d'efficacité. La valeur surlignée en bleu représente l'efficacité la plus faible pour les gènes de référence.

De ces valeurs d'efficacité, nous avons tracé un graphique représentant la répartition des efficacités de nos sondes.

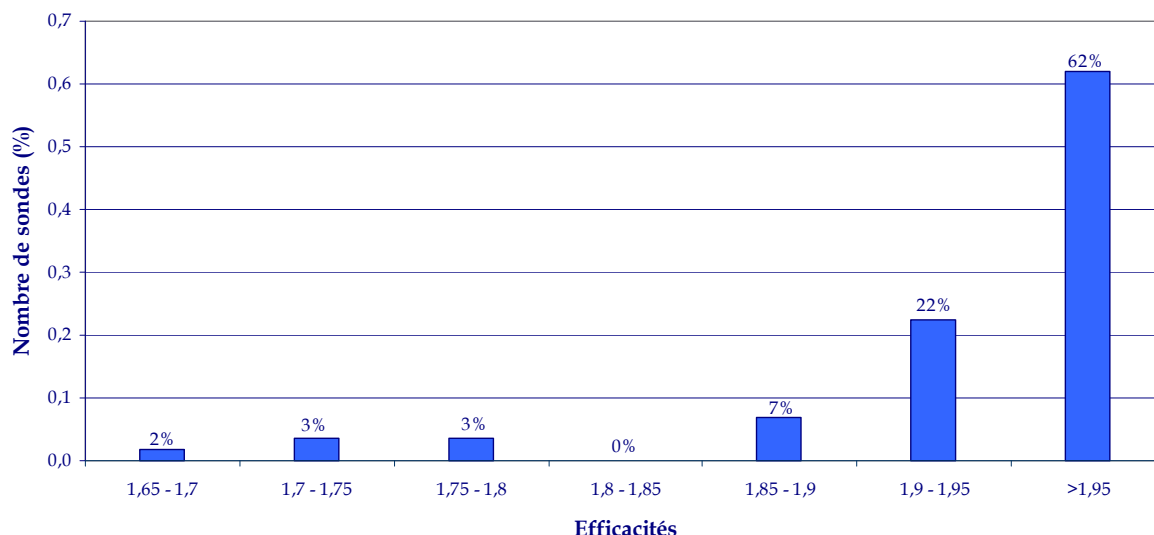


Figure 21 : Répartition des efficacités de nos sondes

Nous pouvons voir que 60% de nos sondes ont une efficacité supérieure à 1,95 et que 90% de nos sondes ont une efficacité supérieure à 1,85.

Nous avons estimé l'erreur que nous faisons en calculant des quantifications relatives avec la formule $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$, alors que l'efficacité réelle du gène cible et du gène de référence est inférieure à 2. Pour cela, nous avons pris trois exemples illustrant des conditions que nous avons rencontrées pendant nos expériences :

- une faible variation (généralement rencontrée lors d'études *in vivo*) où nous avons fixé un $\Delta\Delta Ct$ de 2 soit un RQ de 4
- une variation moyenne (que nous avons pu observer lors de traitements de lignées cellulaires) avec un $\Delta\Delta Ct$ de 4 soit un RQ de 16

- une variation très importante (observée entre des lignées sensibles et des lignées rendues résistantes à un cytotoxique) avec un $\Delta\Delta Ct$ de 10 correspondant à un facteur 1000 de variation.

Nous avons fait ces calculs dans la gamme d'efficacités que nous avons observées pour nos sondes.

Erreur sur un RQ de 4		Efficacité du gène d'intérêt							
		2	1,98	1,95	1,92	1,90	1,85	1,80	1,70
Efficacité du gène de référence	2	1	1,03	1,07	1,11	1,14	1,22	1,30	1,50
	1,98	0,99	1,02	1,06	1,10	1,13	1,21	1,29	1,49
	1,95	0,99	1,01	1,05	1,09	1,12	1,20	1,28	1,48
	1,92	0,98	1,00	1,04	1,09	1,11	1,19	1,28	1,47
	1,9	0,97	1,00	1,04	1,08	1,11	1,18	1,27	1,46
	1,85	0,96	0,99	1,02	1,07	1,09	1,17	1,25	1,44

$\Delta\Delta Ct = 2$; RQ=4

Erreur sur un RQ de 16		Efficacité du gène d'intérêt							
		2	1,98	1,95	1,92	1,90	1,85	1,80	1,70
Efficacité du gène de référence	2	1	1,05	1,12	1,20	1,26	1,42	1,61	2,08
	1,98	0,99	1,04	1,12	1,20	1,25	1,41	1,60	2,07
	1,95	0,99	1,03	1,11	1,19	1,24	1,40	1,59	2,05
	1,92	0,98	1,03	1,10	1,18	1,23	1,39	1,57	2,04
	1,90	0,97	1,02	1,09	1,17	1,23	1,38	1,57	2,03
	1,85	0,96	1,01	1,08	1,16	1,21	1,37	1,55	2,00

$\Delta\Delta Ct = 4$; RQ=16

Erreur sur un RQ de 1024		Efficacité du gène d'intérêt							
		2	1,98	1,95	1,92	1,90	1,85	1,80	1,70
Efficacité du gène de référence	2	1	1,11	1,30	1,54	1,71	2,27	3,02	5,51
	1,98	0,99	1,11	1,30	1,53	1,70	2,26	3,01	5,48
	1,95	0,99	1,10	1,29	1,52	1,69	2,24	2,99	5,44
	1,92	0,98	1,09	1,28	1,50	1,68	2,22	2,96	5,40
	1,90	0,97	1,08	1,27	1,50	1,67	2,21	2,95	5,37
	1,85	0,96	1,07	1,25	1,48	1,65	2,18	2,91	5,30

$\Delta\Delta Ct = 10$; RQ=1024

Tableaux 7 : Calcul de l'erreur

Ces trois tableaux représentent l'erreur due à la quantification relative en appliquant la formule $RQ = 2^{\Delta\Delta Ct}$. L'erreur est calculée selon la formule :

$$\text{Erreur} = \frac{2^{\Delta\Delta Ct}}{\frac{E_{\text{gène d'intérêt}}^{\Delta Ct} E_{\text{gène d'intérêt}}}{E_{\text{gène de référence}}^{\Delta Ct} E_{\text{gène de référence}}}} = \frac{RQ_{\text{théorique}}}{RQ_{\text{réel}}}$$

La gamme d'efficacité utilisée va de 2 à 1,7 pour le gène d'intérêt et de 2 à 1,85 pour le gène de référence. Ces gammes correspondent aux valeurs d'efficacité que nous avons évaluées pour nos sondes. Le ΔCt de notre gène de référence variant peu dans nos expériences, nous l'avons fixé arbitrairement à 0,5. Nous avons calculé cette erreur pour 3 valeurs de $\Delta\Delta Ct$ différentes (2 ; 4 ; 10 correspondant respectivement à des $RQ_{\text{théorique}}$ de 4 ; 16 ; 1024). Les cellules surlignées en rouge nous montrent les cas où en appliquant la formule $RQ = 2^{\Delta\Delta Ct}$ nous surestimons ce ratio de plus de 2 fois.

Exemple : Pour un $\Delta\Delta Ct$ de 10, si l'efficacité du gène d'intérêt est de 1,8 le ratio calculé avec la formule $RQ = 2^{\Delta\Delta Ct}$ sera surestimé d'un facteur 3. Le ratio réel sera donc 340 au lieu de 1024.

Ces tableaux nous montrent que pour un ratio relativement faible (RQ=4) l'erreur commise est faible. En revanche, pour un ratio théorique de 16, si l'efficacité du gène cible est de 1,7, le ratio sera surestimé d'un facteur 2 environ. Seules 4 de nos sondes ont une efficacité comprise entre 1,7 et 1,8, il s'agit des transporteurs ABCC13, ABCC5, ABCB5 et ABCD2. Lors de nos expériences, nous n'avons eu pour ces transporteurs que des ratios inférieurs à 16. Enfin, pour de fortes variations (RQ=1024), l'incidence de l'efficacité est plus importante, il faudra se méfier d'efficacités comprises entre 1,8 et 1,7 ; toutefois, ces valeurs ne concernent que 12% de nos sondes.

III BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, C. L., J. L. Jensen and T. F. Orntoft (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." Cancer Res **64**(15): 5245-50.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." J Bacteriol **127**(3): 1550-7.
- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, B. A. Giesendorf, J. L. Pennings, E. T. Waas, T. Feuth, *et al.* (2005). "Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes." Lab Invest **85**(1): 154-9.
- Eisenberg, E. and E. Y. Levanon (2003). "Human housekeeping genes are compact." Trends Genet **19**(7): 362-5.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. A. Phys. **2**: 57-75.
- Goidin, D., A. Mamessier, M. J. Staquet, D. Schmitt and O. Berthier-Vergnes (2001). "Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations." Anal Biochem **295**(1): 17-21.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-94.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh and R. Griffith (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-7.
- Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson and D.H. Gelfand (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proc Natl Acad Sci USA **88**: 7276-7280.
- Hsiao, L. L., F. Dangond, T. Yoshida, R. Hong, R. V. Jensen, J. Misra, *et al.* (2001). "A compendium of gene expression in normal human tissues." Physiol Genomics **7**(2): 97-104.
- Lie, Y. S. and C. J. Petropoulos (1998). "Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays." Curr Opin Biotechnol **9**(1): 43-8.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Murphy, C. L. and J. M. Polak (2002). "Differentiating embryonic stem cells: GAPDH, but neither HPRT nor beta-tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels." Tissue Eng **8**(4): 551-9.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet and T. P. Neuvians (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations." Biotechnol Lett **26**(6): 509-15.
- Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Deprez and A. F. Moorman (2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." Neurosci Lett **339**(1): 62-6.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, *et al.* (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Schmittgen, T. D. and B. A. Zakrajsek (2000). "Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR." J Biochem Biophys Methods **46**(1-2): 69-81.
- Stahlberg, A., J. Hakansson, X. Xian, H. Semb and M. Kubista (2004). "Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification." Clin Chem **50**(3): 509-15.
- Szabo, A., C. M. Perou, M. Karaca, L. Perreard, J. F. Quackenbush and P. S. Bernard (2004). "Statistical modeling for selecting housekeeper genes." Genome Biol **5**(8): R59.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, *et al.* (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- Warrington, J. A., A. Nair, M. Mahadevappa and M. Tsyganskaya (2000). "Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/ maintenance genes." Physiol Genomics **2**(3): 143-7.

Chapitre III

Effet de la colchicine sur l'expression des transporteurs ABC

Chapitre III Effet de la colchicine sur l'expression des transporteurs ABC

I INTRODUCTION

1 La colchicine

La colchicine a été isolée en 1820 par les chimistes français P.J. Pelletier et J.B. Caventou (Pelletier and Caventou 1820). La colchicine est un alcaloïde, extrait de la colchique, qui appartient à la famille des poisons du fuseau. Son effet antimitotique est en rapport avec sa liaison à la tubuline. Cette liaison empêche la polymérisation des microtubules et bloque les cellules en métaphase (Sackett and Varma 1993). Elle désorganise le cytosquelette en se liant à la tubuline, bloque la mitose, mais de plus inhibe la mobilité et l'activité des neutrophiles, entraînant un effet anti-inflammatoire. La colchicine est utilisée, en thérapeutique, dans le traitement de la fièvre méditerranéenne familiale (Cheung and Pugliese 1975). Son utilisation concerne aussi le traitement de pathologies inflammatoires comme : la crise de goutte (Davis 1969), et la maladie de Behçet (Vordermark and Hudson 1984), mais aussi la sclérodermie (Alarcon-Segovia *et al.* 1979). Plus récemment, on lui a trouvé des applications dans le traitement des péricardites récidivantes ou récalcitrantes (Adler *et al.* 1998).

Trois protéines jouent un rôle clef dans la pharmacocinétique de la colchicine : sa cible la tubuline, le cytochrome CYP3A4 intervenant dans sa métabolisation et ABCB1 qui régule la distribution dans les tissus et son excrétion rénale et biliaire (Niel and Scherrmann 2006).

2 La mucoviscidose

2.1 Historique

Les premiers rapports médicaux évoquant cette maladie, datent du moyen âge. À cette époque, les médecins rapportaient que les enfants dont la peau laissait un goût salé avaient une espérance de vie très limitée. C'est en 1936 que le professeur Guido Fanconi l'a décrit pour la première fois (Fanconi *et al.* 1936). La mucoviscidose est désignée par le terme « Cystic Fibrosis » (CF) dans les pays anglo-saxons. C'est en

1946 que Andersen et Hodges ont démontré pour la première fois que cette maladie était génétique, et quelle résultait d'une mutation récessive autosomale (Andersen and Hodges 1946). Dans les années 80, l'anomalie du transport de sels fut précisée : défaut de perméabilité aux ions chlorure (Cl-) affectant les cellules épithéliales des glandes sudoripares, et au niveau de l'épithélium respiratoire. En 1985, le locus CF fut localisé sur le chromosome 7 (Wainwright *et al.* 1985).

En 1989, le gène CFTR responsable de la maladie, a été isolé (Riordan *et al.* 1989). Ce gène est localisé en 7q31 et contient 27 exons.

2.2 Epidémiologie, Diagnostic et Symptômes.

La mucoviscidose est la maladie génétique récessive, autosomale, létale, la plus répandue dans les populations originaires d'Europe du Nord. Un enfant sur 2500 naît atteint de cette maladie, ce qui permet d'évaluer à un sur 25 les individus hétérozygotes. Cependant la fréquence de l'affection varie selon l'origine géographique et ethnique des patients.

Le diagnostic positif de la mucoviscidose repose sur le test de la sueur. Une autre technique consiste à mesurer la différence de potentiel transépithélial (DDPTE) qui existe entre la peau et la muqueuse nasale. Le diagnostic clinique est très polymorphe. Chez la plupart des patients le diagnostic est posé avant l'adolescence, mais quelques uns restent asymptomatiques jusqu'à l'âge adulte.

Chez les patients atteints de mucoviscidose on observe des dysfonctionnements dans de multiples tissus tels que les voies respiratoires, le pancréas, le foie, l'intestin, les canaux déférents, et les glandes sudoripares. Ceci conduit à de nombreux symptômes comme des insuffisances respiratoires et pancréatiques, une infertilité masculine, et une modification de la concentration saline de la sueur. Les affections pulmonaires sont la principale cause de mortalité chez les patients CF. L'augmentation de viscosité du mucus entraîne une obstruction progressive des voies respiratoires et crée un environnement propice aux infections bactériennes opportunistes. Les tissus respiratoires des malades CF sont rapidement et abondamment colonisés par des bactéries comme *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et surtout *Pseudomonas aeruginosa* dans les stades tardifs de l'infection. Une fois l'infection bactérienne installée il est très difficile, voire impossible, de l'éradiquer.

On comprend mal pourquoi ces bactéries sont détruites à la surface des épithéliums normaux mais pas des épithéliums CF. D'après Jeffrey J Smith et collaborateurs il faut une faible concentration en NaCl dans les fluides recouvrant les épithéliums respiratoires pour permettre la destruction de ces bactéries. A l'inverse, la forte concentration en NaCl mesurée dans le cas des épithéliums CF expliquerait la persistance des infections bactériennes (Smith *et al.* 1996).

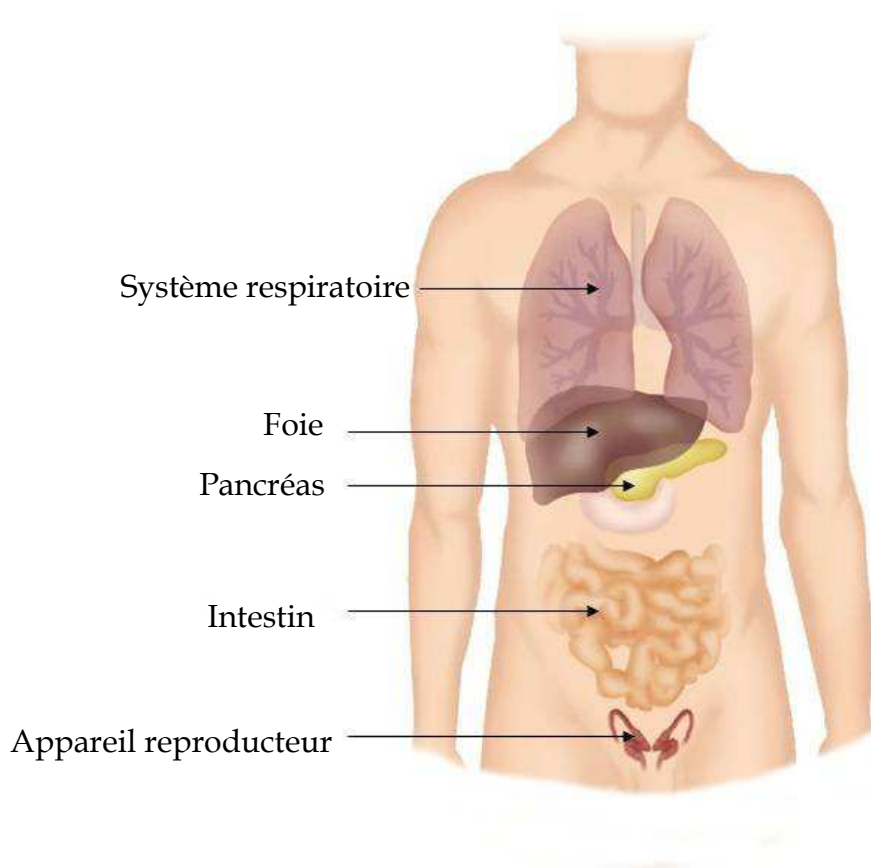


Figure 22 : Les différents organes qui peuvent être touchés chez des patients atteints de mucoviscidose

2.3 Pronostic

En l'absence de traitement, la médiane de survie est de 3 à 5 ans. Les progrès médicaux réalisés dans le traitement de cette pathologie ont fait évoluer l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose, de la petite enfance à 35-45 ans, suivant les pays, avec une importante réduction de la mortalité infantile. Cependant, on ne dispose pas à l'heure actuelle de traitements efficaces pour ralentir la destruction des tissus pulmonaires et pancréatiques.

Les traitements actuels sont symptomatiques : kinésithérapie respiratoire, antibiothérapie, broncho-dilatateurs et mucolytiques, administration d'inhibiteurs de protéases pour les manifestations pulmonaires et apport d'enzymes pancréatiques de substitution et de vitamines pour pallier l'insuffisance pancréatique.

Une transplantation cœur-poumons voire cœur-poumons-foie n'a eu lieu que dans les atteintes très évoluées.

2.4 Implication du canal CFTR/ABCC7.

Depuis 1989 nous savons que des mutations du gène CFTR sont associées à la mucoviscidose. Le gène CFTR de 250 kpb code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés. L'activité du canal CFTR est principalement associée au transport d'ions chlorures et à la régulation d'autres canaux ioniques épithéliaux (Figure 23). Ce canal chlorure, activé par l'AMPc, appartient à la superfamille des transporteurs ABC. Dans la nomenclature ABC, CFTR appartient à la sous-famille C et correspond à ABCC7. Le canal CFTR est exprimé dans les tissus épithéliaux sécréteurs des glandes sudoripares, du pancréas, de l'intestin, des canaux biliaires, des systèmes génitaux, dans les voies respiratoires, ainsi que dans les cellules cardiaques.

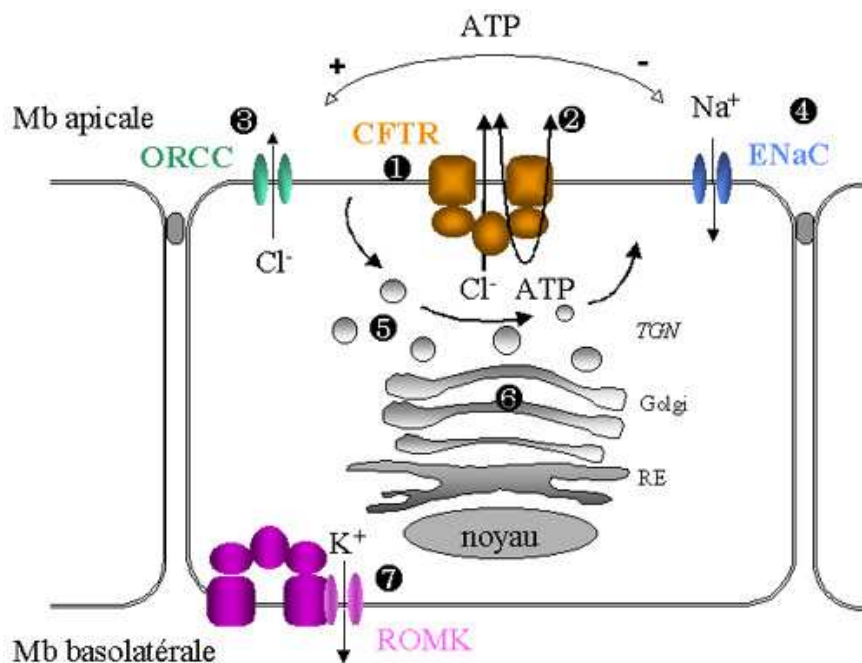


Figure 23: Le rôle du canal CFTR

Plus de 700 mutations de cette protéine ont été recensées. Elles induisent des dysfonctionnements ou un défaut de localisation du canal CFTR à la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales. Cependant, la délétion d'une phénylalanine en position 508, notée $\Delta F508$, représente 70% des mutations observées dans les cas de mucoviscidose. La protéine CFTR, mutée, est reconnue par les protéines chaperons et éliminée avant son insertion dans la membrane. Cette mutation empêche la protéine d'accéder à la surface des cellules épithéliales, puis conduit généralement très tôt à sa dégradation. Moins de 1% des protéines $\Delta F508$ se retrouveront adressées à la membrane. Ce défaut d'adressage provoque les défauts de conductance observés.

Les épithéliums CF ne sécrètent pas de chlorure en réponse à l'AMP cyclique, et présentent une absorption accrue de sodium. Ce dérèglement dans le transport d'électrolytes a pour conséquence une augmentation importante de la viscosité du

mucus recouvrant les voies aériennes. Les hétérozygotes, pour lesquels 50% de la protéine est fonctionnelle, ne présentent pas de symptômes (Pilewski and Frizzell 1999). Bien que de nombreux progrès aient été réalisés dans la connaissance de la biologie et de la biochimie du canal CFTR, on comprend mal l'importance des désordres physiopathologiques observés notamment au niveau des voies respiratoires.

2.5 Stratégies de correction des phénotypes CF

De nombreuses stratégies sont utilisées pour pallier les désordres physiologiques observés dans les différents tissus CF. Ces études concernent tous les aspects de la biologie et de la biochimie du canal CFTR. Elles incluent notamment des tentatives de thérapie génique, des essais de modulation du transport d'électrolytes par activation d'autres canaux chlorure présents dans les membranes apicales des épithéliums, des études de pharmacologie pour développer des molécules activatrices des canaux CFTR présents à la membrane et des essais de modulation de l'adressage de la protéine.

Les essais de thérapie génique ont pour but de délivrer directement dans les cellules le gène codant pour la protéine CFTR sauvage, afin de rétablir une expression du gène et un adressage correct à la membrane apicale. De nombreux véhicules pouvant transférer le gène CFTR sont étudiés. Actuellement aucun traitement efficace n'a été découvert.

À côté de ces essais impliquant directement le canal CFTR, des tentatives médicales visent à diminuer les problèmes respiratoires. Dans ce sens, des tentatives sont réalisées dans le but de fluidifier le mucus.

Un autre aspect des affections pulmonaires est l'importante inflammation de ces tissus. L'utilisation de fortes doses d'ibuprofène administrées chez de jeunes enfants avant que n'apparaissent les processus d'inflammation et d'infection pulmonaire pourrait ralentir le déclin des fonctions pulmonaires.

3 Intérêt de la colchicine pour le traitement de la mucoviscidose

En 1997, une étude a reporté le cas d'un patient atteint de mucoviscidose traité par cyclophosphamide et épiburicine suite à un fibrosarcome. Ce traitement a eu un effet bénéfique sur les symptômes liés à sa mucoviscidose, notamment une amélioration des fonctions pulmonaires, avec un effet durable pendant 4 ans après l'arrêt de la chimiothérapie (Lallemand *et al.* 1997). Une surexpression des transporteurs ABCB1 et ABCC1 chez ce patient a été observée après la chimiothérapie. L'amélioration chez ce patient pourrait donc être due à la complémentation fonctionnelle du transporteur

ABCC7 déficient par d'autres protéines ABC telles qu'ABCB1 et ABCC1 ou d'autres membres de cette famille stimulés par la chimiothérapie.

Bien que la fonction la plus connue de CFTR soit le transport d'ions chlorure, cette protéine est également capable de transporter du glutathion (Kogan *et al.* 2003) ou certains de ces adduits, comme le font d'autres transporteurs ABC de la sous famille C. Ces autres transporteurs proches de CFTR, pourraient donc assurer, chez des patients atteints de mucoviscidose, le transport déficient et donc compléter fonctionnellement la protéine ABCC7.

Des essais cliniques ont été réalisés afin d'étudier la complémentation possible de CFTR, en induisant certaines protéines ABC par la colchicine.

L'utilisation de la colchicine pour le traitement de la mucoviscidose présente différents intérêts. D'une part, son action anti-inflammatoire peut être utile dans le traitement de l'inflammation chronique caractéristique de cette affection pulmonaire. Elle permettrait également d'augmenter *in vitro* l'efflux d'ions chlorure par des canaux autres que CFTR (Dragomir and Roomans 2004). D'autre part, la colchicine, comme d'autres cytotoxiques, peut induire un phénotype de multirésistance aux drogues caractérisé par la surexpression certains transporteurs ABC.

Les études cliniques utilisant la colchicine, réalisées sur des patients atteints de mucoviscidose, montrent que la capacité respiratoire des sujets a été globalement améliorée, avec cependant une forte dispersion des résultats (Sermet-Gaudelus *et al.* 1999; Witko-Sarsat *et al.* 1999).

L'amélioration des symptômes des patients traités par de la colchicine souligne l'intérêt de mesurer précisément quels transporteurs ABC pourraient être induits par ce traitement colchicine.

II MODELES D'ETUDE

Nous avons choisi deux modèles d'étude nous permettant de mesurer l'effet d'un traitement par la colchicine sur l'expression des transporteurs ABC. Nous avons tout d'abord étudié l'effet d'un tel traitement sur des lignées cellulaires myéloïdes (HL60 et K562) *in vitro*. Puis nous avons observé l'effet d'un traitement colchicine *in vivo* sur différents organes de souris C57Bl6.

III RESULTATS

1 Résultats *in vitro* : traitement de cellules HL60 et K562 par la colchicine

Dans ces expériences, nous avons mesuré les variations d'expression de transporteurs ABC suite à un traitement colchicine sur deux lignées cellulaires sensibles différentes. Le profil d'expression de l'ensemble des transporteurs ABC humains a été testé sur des échantillons, traités ou non traités. Les PCR ont été effectuées sur des TLDA comprenant les sondes de 49 transporteurs ABC et 11 gènes. Ce travail a nécessité environ 800 PCR quantitative.

1.1 Traitements effectués

Les lignées cellulaires ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr. Jean-Pierre Marie. Nous disposons de deux types de lignées cellulaires humaines une lignée myéloïde aiguë (HL60) et une lignée myéloïde chronique (K562).

Les lignées ont été incubées avec de la colchicine ajoutée dans le milieu de culture à trois concentrations différentes : $10^{-7}M$, $10^{-8}M$ et $10^{-9}M$. Les cellules sont ensuite prélevées après 48h et 72h de traitement pour la concentration $10^{-7}M$ et après 72h de traitement pour les concentrations $10^{-8}M$ et $10^{-9}M$. Ces temps d'incubation ont été choisis par analogie avec les tests de cytotoxicité généralement réalisés sur ces lignées cellulaires. A la fin des traitements, les cellules ont été lavées avec du milieu de culture afin d'éliminer les cellules mortes. Les cellules sont comptées pour récupérer environ 3.10^6 cellules par échantillon.

Les cellules de contrôle sans ajout de colchicine ont été prélevées aux mêmes temps d'incubation.

1.2 Choix des meilleurs gènes de référence

Le dosage de l'expression des gènes par PCR quantitative dans des lignées cellulaires différentes et dans des cellules traitées nécessite une bonne normalisation des données de PCR permettant de corriger les variations éventuelle de quantité d'ADNc entre les échantillons.

Nous avons analysé l'expression de 11 gènes de référence couramment utilisés pour la normalisation. Nous avons utilisé le logiciel GeNorm pour mesurer leur stabilité d'expression. La Figure 24 nous montre les résultats obtenus pour l'étude de stabilité des 11 gènes de référence. En abscisse, les gènes sont classés du moins stable au plus stable, en valeur de stabilité sur l'ensemble des populations cellulaires testées.

Au vue de ces résultats, nous avons choisi de normaliser nos données par la moyenne des deux gènes de référence les plus stables dans ces conditions : AAMP et PPIA.

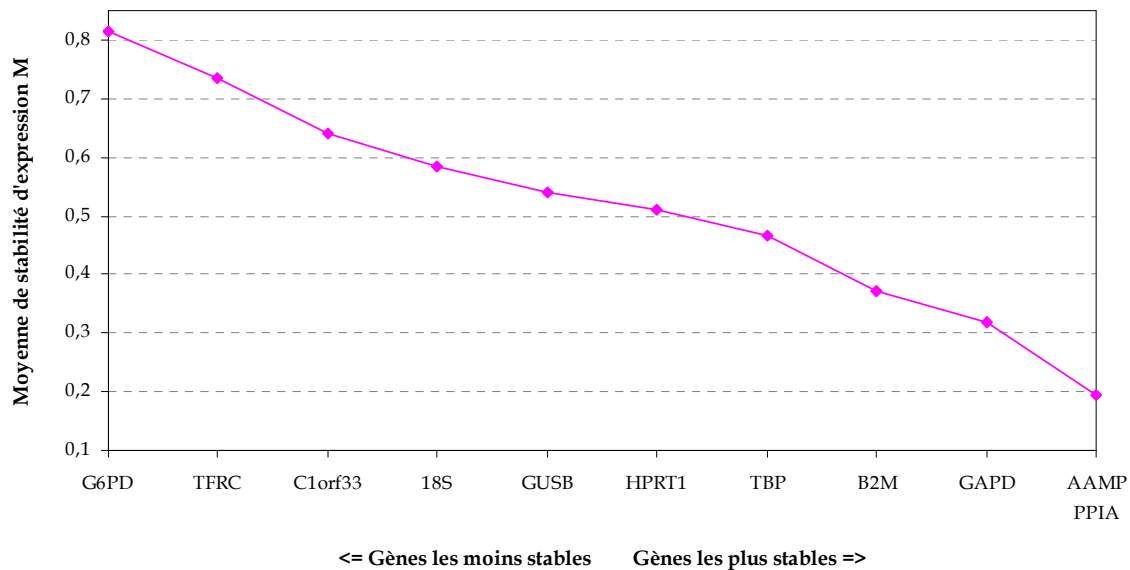


Figure 24 : Moyenne des valeurs de stabilité d'expression des gènes de référence.

1.3 Incidence du traitement sur l'expression des transporteurs ABC

Lignée HL60

L'expression de la grande majorité des transporteurs ABC n'est pas affectée par le traitement colchicine. La concentration $10^{-9}M$ ne semble pas avoir d'incidence sur l'expression des transporteurs ABC. Cependant, l'ajout de colchicine induit la variation d'expression de 4 transporteurs ABC aux concentrations $10^{-7}M$ et $10^{-8}M$

- ABCA1 est le transporteur ABC qui a la plus faible augmentation. Il augmente d'un facteur 5 après 48h de traitement à $10^{-7}M$ et 72 heures de traitement à $10^{-8}M$; et de 8 fois après 72 heures de traitement à $10^{-7}M$.

- ABCA6 est le seul transporteur dont l'expression est maximale après 48 heures de traitement à $10^{-7}M$ de colchicine (22 fois d'augmentation par rapport au contrôle). Au temps 72h son expression n'augmente que de 4 et 7 fois respectivement à $10^{-8}M$ et $10^{-7}M$.

- L'expression d'ABCA9 augmente également après ce traitement de 27 fois à 48 heures et de 11 et 60 fois à $10^{-8}M$ et $10^{-7}M$ après 72 heures de traitement. Cependant étant donné le faible niveau d'expression de ce transporteur ABC, nous estimons préférable de considérer ce résultat avec précaution.

- Enfin ABCB1 est le transporteur ABC pour lequel on observe les plus grandes variations. A 48 heures le facteur observé entre les cellules contrôle et les cellules traitées n'est que de 4 ; mais à 72 heures, le traitement par $10^{-8}M$ de colchicine conduit à une augmentation d'expression de l'ARN messager de près de 400 fois.

En revanche pour ce même temps d'exposition au cytotoxique, à la concentration $10^{-7}M$ le facteur d'augmentation n'est que de 26.

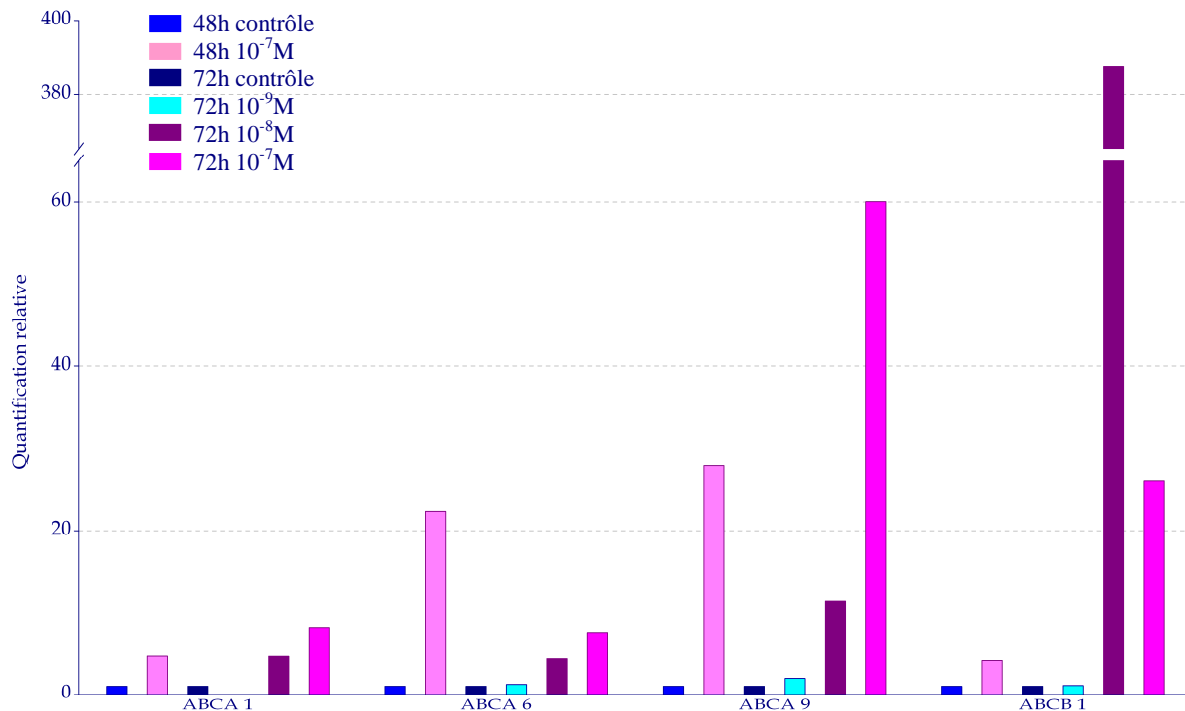


Figure 25 : Quantification relative de l'augmentation d'expression de transporteurs ABC dans les cellules HL60 suite à un traitement par de la colchicine.

Lignée K562

Dans le type cellulaire K562, le nombre de transporteurs ABC pour lesquels on observe une variation est plus faible que pour les HL60. L'expression d'un seul transporteur, ABCB1, est augmentée. Son expression augmente de 2 fois (aux doses 10^{-9} et $10^{-8}M$ à 72h) ; de près de 50 fois après 48 heures de traitement à $10^{-7}M$; et jusqu'à plus de 60 fois suite à 72 heures de traitement à $10^{-7}M$ (Figure 26).

Pour évaluer le niveau d'expression protéique du transporteur ABCB1, nous avons utilisé une technique de cytométrie de flux (collaboration avec J. Bignon, ICSN). Nous avons confirmé la surexpression du transporteur ABCB1 dans les cellules K562 traitées avec $10^{-7}M$ de colchicine pendant 48h. Nous détectons effectivement une variation de quantité de cette protéine ABCB1 dans les cellules traitées (en rouge) contenant 3 fois plus d'ABCB1 que les cellules contrôle (en jaune) (Figure 27).

Il est difficile de comparer directement les ratios obtenus en PCR quantitative (quantité d'ARN) avec ceux mesurés en cytométrie de flux (quantité de protéines) en raison du niveau extrêmement faible d'ABCB1 dans les cellules non traitées qui se situe à la limite de sensibilité de ces 2 techniques.

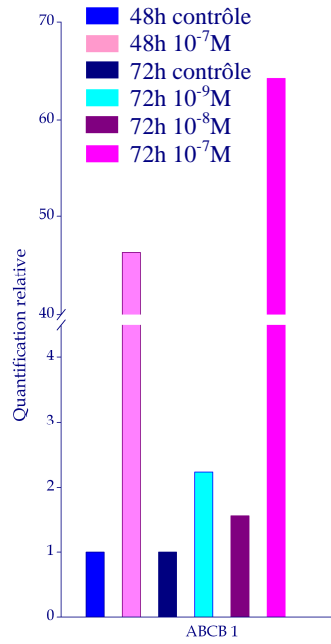


Figure 26 : Quantification relative de l'expression de transporteurs ABC dans les cellules K562 suite à un traitement par de la colchicine.

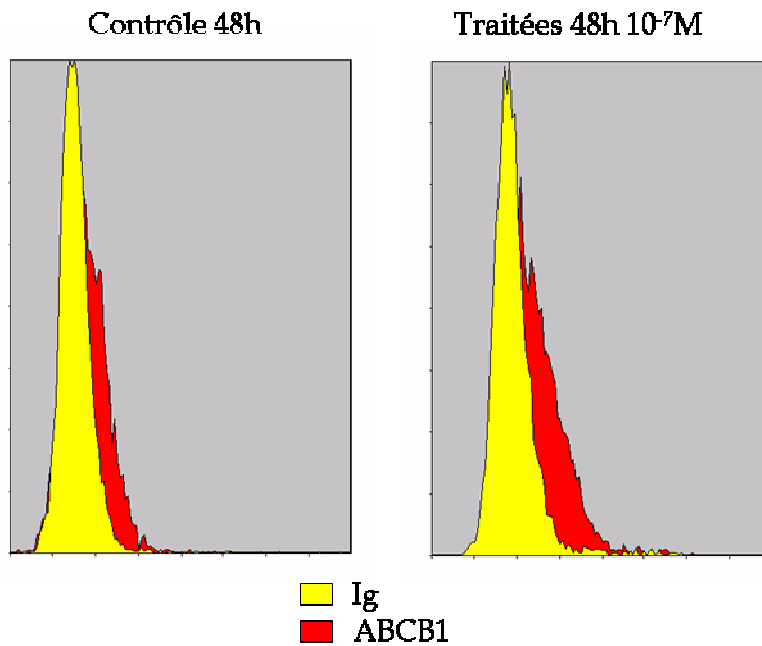


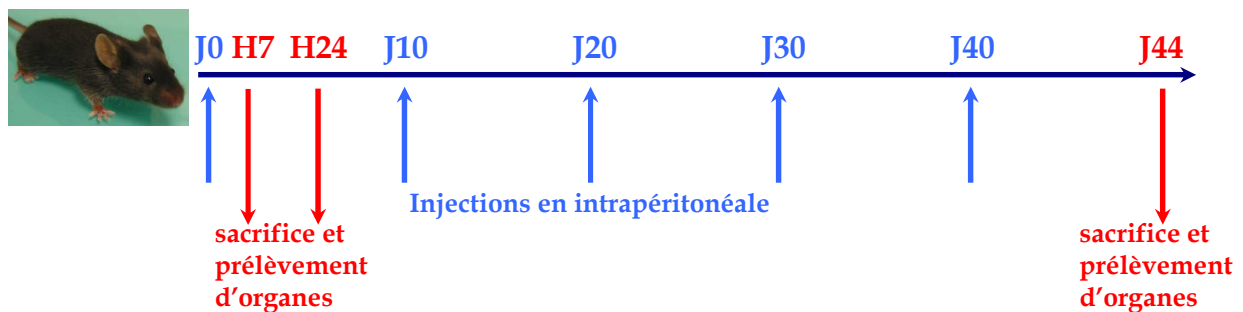
Figure 27 : Comparaison par cytométrie de flux de la présence de la protéine ABCB1 sur des cellules K562 non traitées ou traitées avec 10⁻⁷M de colchicine.

2 Résultats *in vivo* : traitement de souris C57Bl6 par la colchicine

Pour réaliser cette étude, nous avons élaboré une carte microfluidique contenant cette fois les sondes des transporteurs ABC de souris. Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus en réalisant environ 7 000 PCR quantitatives à partir de 80 échantillons d'organes provenant de 24 souris utilisées pour tester l'expression de 86 gènes différents.

2.1 Traitements effectués

Nous avons étudié l'effet d'une injection de colchicine sur des souris C57Bl6. Pour chaque condition de cinétique testée, un groupe de 4 souris a été traité par des injections intrapéritonéales de 2mg/kg de colchicine. En parallèle un autre groupe de 4 souris a été injecté avec du sérum physiologique. Nous avons suivi l'effet de ce traitement sur 3 organes murins différents (foie, poumon, intestin) 7 heures après l'injection ou 24 heures après l'injection. Sur d'autres lots de souris, nous avons mesuré l'effet un traitement plus long, qui consiste en 5 injections de 2 mg/kg de colchicine (1 injection tous les 10 jours), sur 4 organes différents (foie, poumon, intestin, pancréas). Le sacrifice des souris étant 44 jours après la première injection.



2.2 Gènes d'intérêt testés

Nous avons mesuré l'expression des 46 transporteurs murins, mais également d'autres gènes d'intérêt : 8 canaux chlorure, 8 cytochromes, 7 enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion, 6 transcrits impliqués dans l'inflammation ainsi que la phospholipase A2 et l'annexine 1.

2.3 Choix des meilleurs gènes de référence

Parallèlement à nos gènes d'intérêt, nous avons testé l'expression de 9 gènes de référence. Nous avons ensuite mesuré la stabilité d'expression de ces 9 gènes de référence sur l'ensemble de nos échantillons (contrôle-traité) sur les 4 organes que nous avons analysés. Selon le logiciel GeNorm, nous avons choisi d'utiliser les 2 meilleurs gènes pour normaliser nos données (Figure 28), les deux gènes les plus stables étant Hmbs et Pgk1 (Figure 29).

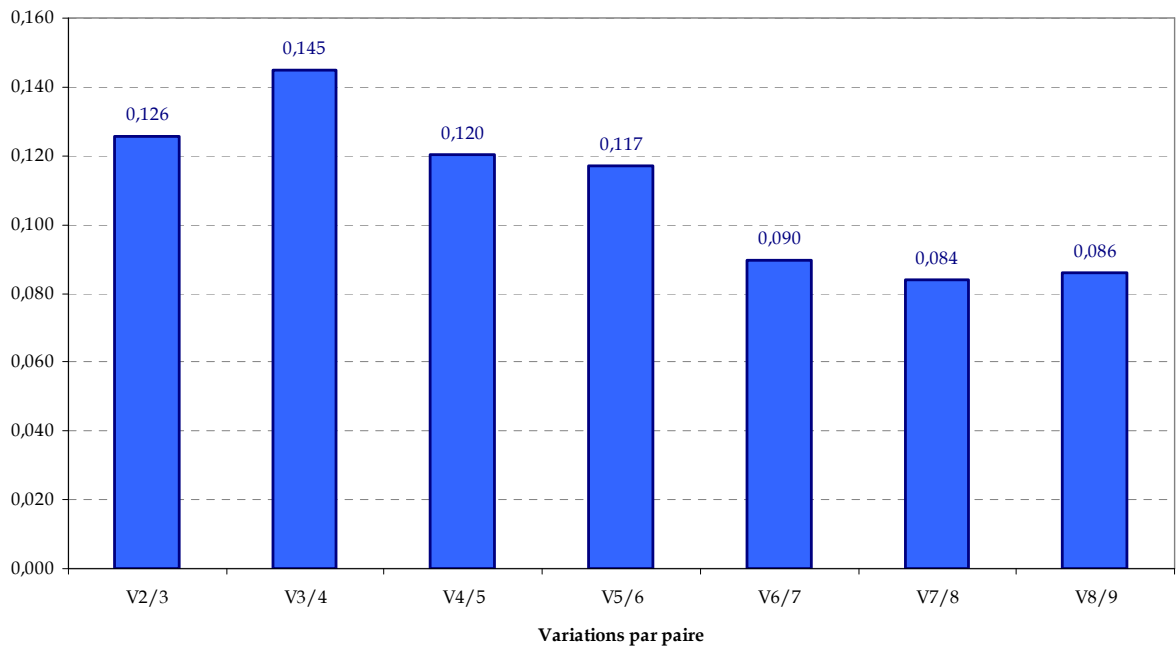


Figure 28 : Détermination du nombre optimal de gènes de référence pour la normalisation.

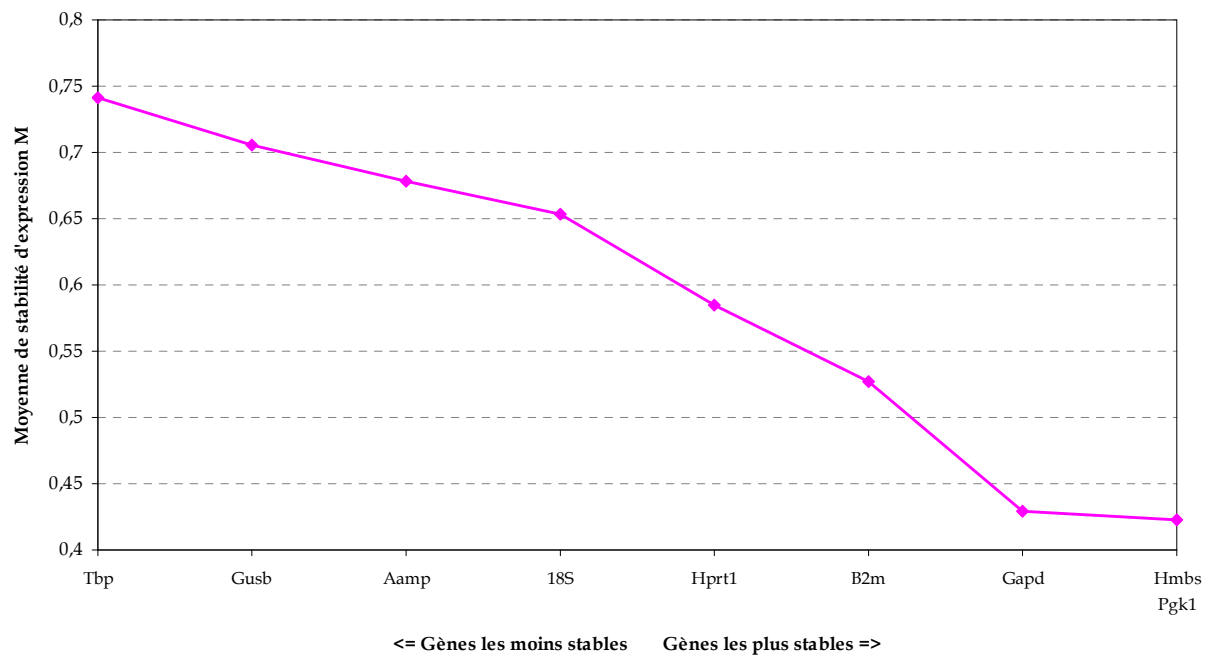


Figure 29 : Moyenne des valeurs de stabilité d'expression des gènes de référence.

2.4 Comparaison de l'expression des transporteurs ABC dans les organes non traités de souris

Avant d'analyser les variations d'expression suite à un traitement colchicine, nous avons voulu caractériser les variations d'expression en transporteurs ABC entre les 4 organes : le foie, le poumon, l'intestin et le pancréas. Afin de comparer les différences d'expression, nous avons tracé les valeurs médianes des Ct normalisés obtenues pour chaque transporteur ABC (Figure 30). Chaque cercle concentrique est séparé du suivant par 3,33 Ct soit un facteur 10 de variation d'expression. Le cercle extérieur correspondant à la valeur maximale d'expression.

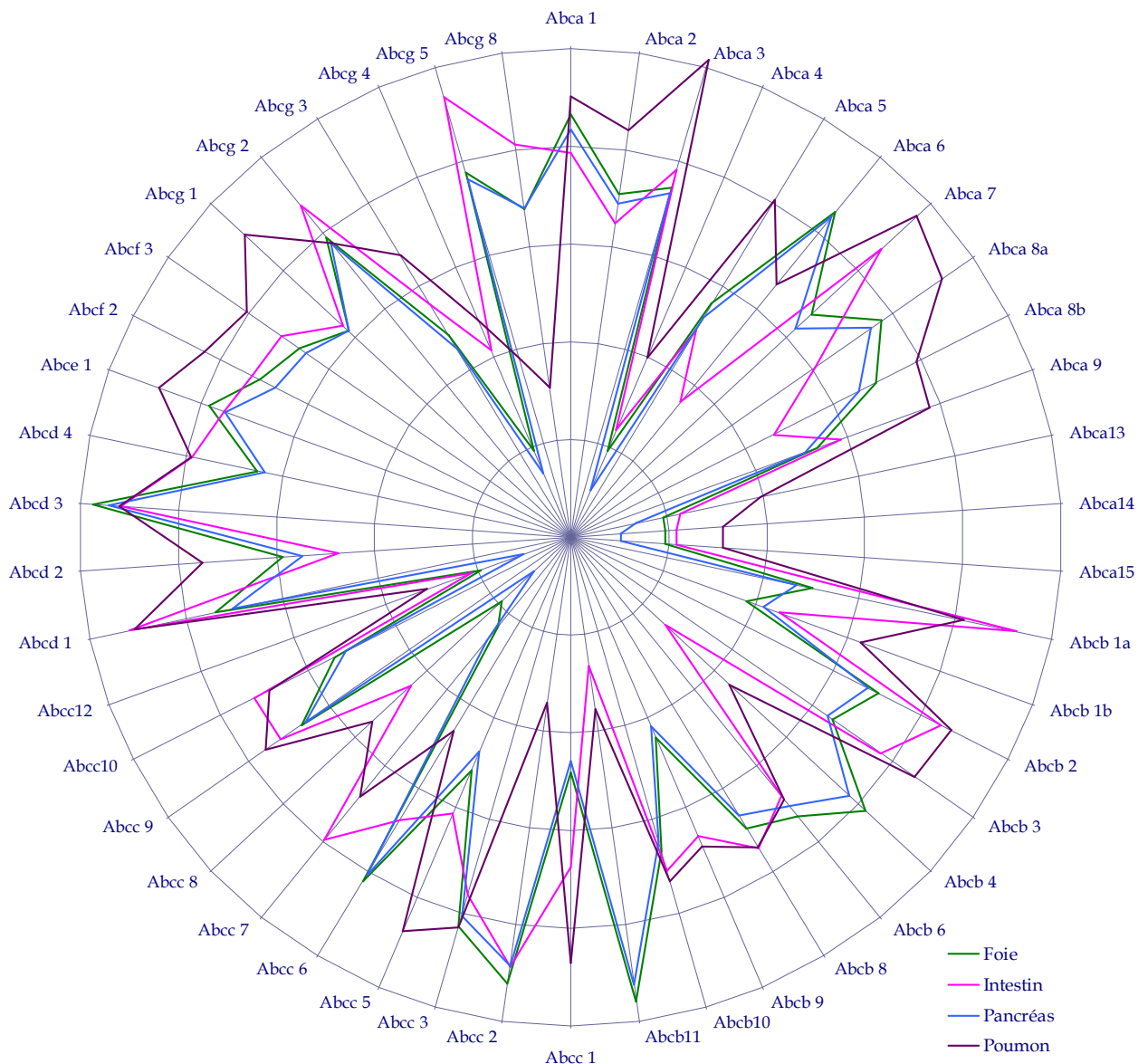


Figure 30 : Comparaison de l'expression des transporteurs ABC dans 4 organes murins.

Nous avons choisi une deuxième représentation permettant d'illustrer l'abondance des 46 transporteurs ABC murins dans les 4 organes de souris (Figure 31).

Les 46 transporteurs ABC testés sont en lignes, et les organes des souris non traitées sont en colonnes. Chaque rectangle représente une réaction de PCR. Les couleurs indiquent le niveau d'expression relatif de chaque ABC transporteur : rouge pour les gènes très exprimés, vert pour les gènes absents, en passant par le noir pour une expression moyenne.

Cette figure représente les valeurs de Ct normalisés de chaque échantillon. Cette représentation est centrée sur la valeur médiane de l'ensemble des Ct normalisés de cette expérience. Cette classification hiérarchique (Hierarchical Clustering) a été obtenue en mesurant la distance Euclidienne entre les ABC transporteurs. Le critère d'agrégation des distances utilisé pour la détermination des classes (clusters) est le lien maximum (Complete linkage). Le dendrogramme représente la relation entre les profils d'expression. La longueur des bras est inversement proportionnelle aux similarités des profils d'expression.

Cinq transporteurs sont absents des 4 organes testés : Abca4, Abca13, Abca14, Abca15, Abcc12. En revanche, certains transporteurs sont très bien exprimés dans les 4 organes avec des niveaux d'expression similaires : Abcd3, et de façon moins homogène Abca1, Abcc3 et Abcg2.

Il est intéressant de signaler que le foie et le pancréas ont des profils d'expression en transporteurs ABC similaires voire quasiment identiques (Figure 30). Cependant on arrive à les distinguer en faisant une classification hiérarchique (Figure 31).

Cette ressemblance au niveau des profils d'expression en transporteurs ABC est peut-être due au fait que ces deux organes ont des fonctions de glandes digestives :

- au niveau des acini, le pancréas excrète des enzymes pancréatiques dans la lumière du duodénum. Alors que les îlots de Langerhans sont le siège de la sécrétion endocrine : glucagon, insuline et somatostatine sont sécrétés.

- dans le foie, l'hépatocyte pourvoit à la sécrétion exocrine de la bile dans les canalicules biliaires. Tandis que diverses protéines plasmatiques, dont l'albumine, le fibrinogène et des globulines, sont rejetées dans les espaces de Disse, traversent la paroi des sinusoides et gagnent le flot sanguin.

Le poumon et l'intestin, qui constituent deux barrières muqueuses, ont des profils d'expression très différents du foie et du pancréas, et sont plus proches entre eux, qu'avec les 2 autres organes. A l'instar du pancréas et du foie, ils ont parfois en commun une forte expression de certains transporteurs, comme par exemple Abcb1a et Abcc7. Dans une moindre mesure, d'autres transporteurs comme Abcb2, Abcb3, Abcc8, Abcc10 et Abcd1 sont également mieux représentés dans ces 2 organes.

Le Tableau 8 récapitule les grandes variations d'expression que l'on peut observer entre ces 4 organes.

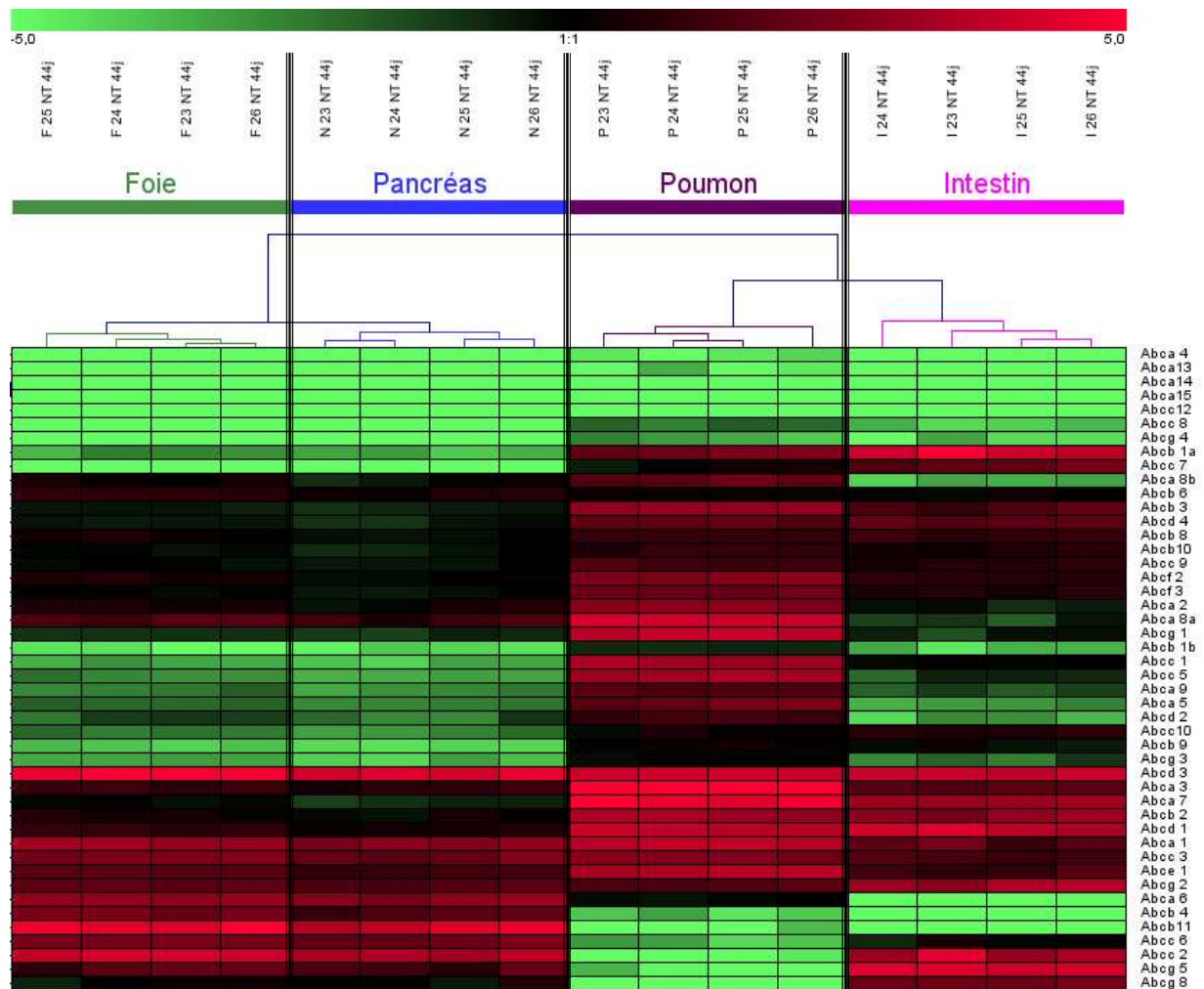


Figure 31 : Abondance des transporteurs ABC dans 4 organes murins.

Tendances observées	Intestin	Poumon	Foie-Pancréas
Très exprimés	Abcb1a	Abcb1a	
	Abcc7	Abcc7	
			Abcb4 Abcb11
Beaucoup plus exprimés dans cet (ces) organe (s)	Abcg5		
	Abcg8		
	Abcb2	Abcb2	
	Abcb3	Abcb3	
	Abcc8	Abcc8	
	Abcc10	Abcc10	
	Abcd1	Abcd1	
	Abcd4	Abcd4	
	Abcg4	Abcg4	
	Abcb9	Abcb9	
		Abca2	
		Abca3	
		Abca5	
		Abca8a	
		Abca8b	
		Abca9	
		Abcb1b	
		Abcc1	
		Abcc5	
		Abcd2	
	Abce1		
	Abcf1		
	Abcf2		
	Abcf3		
	Abcg1		
Moins exprimés dans cet (ces) organe (s)	Abca6		
	Abca8b		
		Abcb4	
		Abcc2	
		Abcc6	
			Abcb9 Abcc1 Abcd4
Quasiment absents	Abcb4		
	Abcb11	Abcb11	
		Abcg5	
		Abcg8	
			Abcc7 Abcc8 Abcg4
Absents dans les 4 organes	Abca4, Abca13, Abca14, Abca15, Abcc12		

Tableau 8 : Variations d'expression entre les différents organes.

Les transporteurs ABC surlignés en jaune correspondent à ceux dont l'expression est similaire dans le poumon et l'intestin.

2.5 Variations d'expression induites par le traitement de souris par la colchicine

Variations communes observées dans 3 organes à 7h de traitement.

Nous avons regardé si certains organes répondaient de façon similaire après un temps court d'exposition à la colchicine. Nous avons remarqué que 3 organes surexprimaient 2 transcrits, uniquement après 7 heures de traitement. En effet le foie, le poumon et l'intestin expriment plus de transcrits *Abcb1b* et *Il1b* (Figure 32). *Abcb1b* est chez la souris, l'un des deux homologues du transporteur ABCB1 humain. *Il1b* est une cytokine pro-inflammatoire.

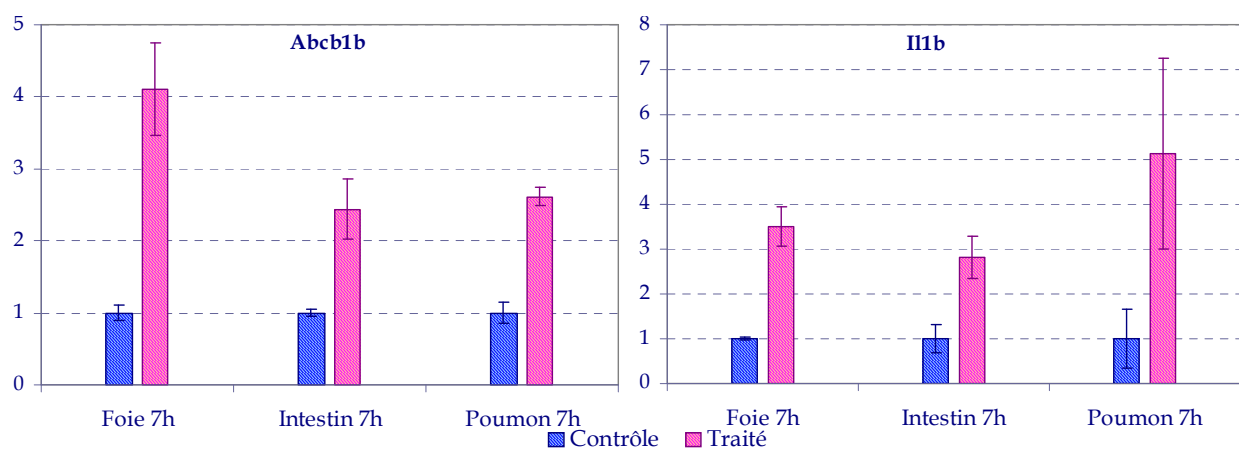


Figure 32 : Augmentation d'expression de deux transcrits dans trois tissus 7 heures après injection.

Variations observées dans le foie 7 heures après injection

Au niveau du foie, notre étude montre que les variations d'expression de certains transcrits apparaissent très rapidement (7 heures après l'injection). Ces variations ne sont plus observées aux temps 24 heures après l'injection ni sur les prélèvements à 44 jours.

- L'expression de 2 transporteurs appartenant à la sous-famille ABCC/MRP augmente d'un facteur 3 environ : *Abcc1* et *Abcc5*. En revanche, l'expression de six transporteurs ABC diminue : *Abcb9*, *Abcd1*, *Abcd2*, *Abcg3*, *Abcg5*, *Abcg8*.

- L'expression d'autres transcrits augmente également. C'est notamment le cas pour les facteurs de transcription *Nfkb1* (3 fois) et *Nfkb2* (8 fois), *Rela* (4 fois) et *Relb* (15 fois).

- L'expression de la cytokine anti-inflammatoire *Il1rn* est fortement augmentée suite à ce traitement court (38 fois).

- L'expression du canal chlorure *Clcn5* est augmentée de 6 fois dans le foie des souris traitées durant 7 heures.

Variations d'expression des transporteurs ABC dans le foie

En plus des variations observées au temps 7 heures, d'autres transporteurs ABC sont surexprimés ou réprimés dans le foie aux trois temps analysés.

- Trois transporteurs ABC sont surexprimés : Abca5, Abcb1a et Abcd2 (Figure 33). Les facteurs d'augmentation se situent aux alentours de 2 à 4 fois. Ces transporteurs montrent une augmentation d'expression aux trois temps d'exposition sauf Abcd2 dont l'expression est réprimée à 7 heures de traitement.

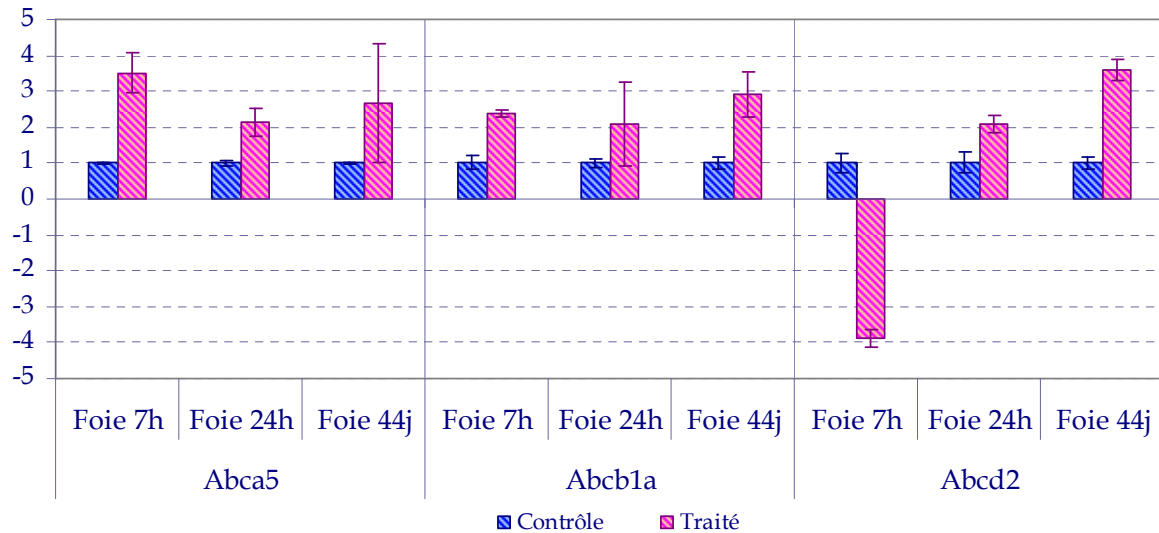


Figure 33 : Augmentation de l'expression de transporteurs ABC dans le foie

- Trois transporteurs sont réprimés : Abca8a, Abcb10 et Abcb11 (Figure 34). Les facteurs de diminution d'expression se situent aux alentours de 2 à 4 fois. Ces trois transporteurs sont bien exprimés dans le foie notamment Abcb11 qui est l'un des transporteurs les plus abondants dans ce tissu.

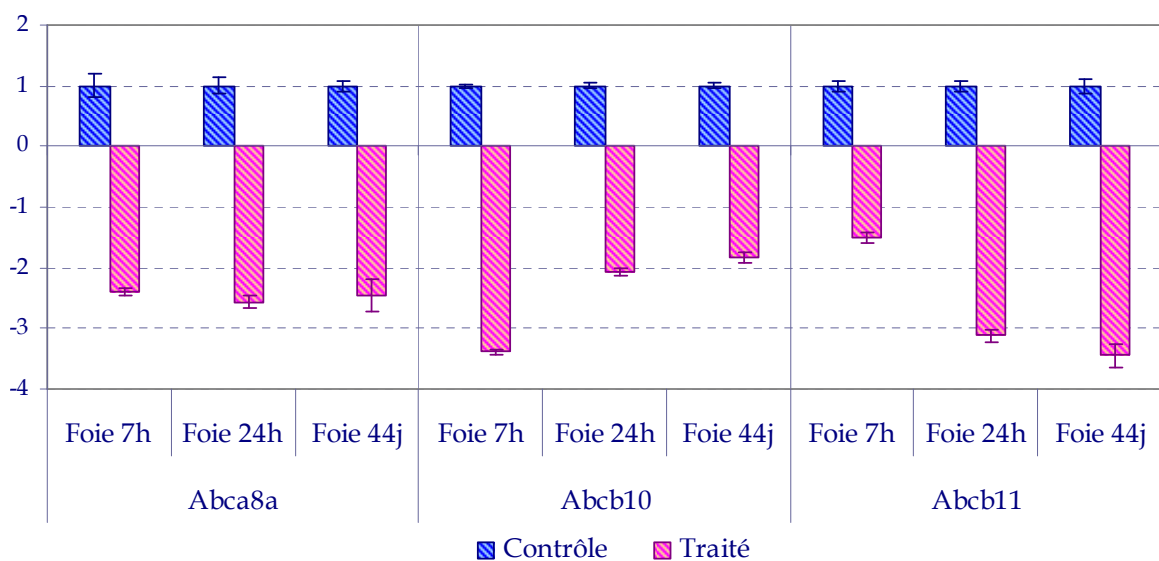


Figure 34 : Diminution de l'expression de transporteurs ABC dans le foie

Variations d'expression d'autres gènes d'intérêt dans le foie

En plus des transporteurs ABC, nous avons mesuré l'expression d'autres transcrits impliqués dans la détoxification, l'inflammation, la résistance ou décrits comme pouvant jouer un rôle dans la mucoviscidose. Pour certains de ces transcrits, nous observons des variations d'expression retrouvées aux différents temps de traitement (Figure 35).

- L'annexine-1 qui est un médiateur anti-inflammatoire est surexprimé d'environ 5 à 3 fois en réponse au traitement colchicine.

- Le Tnf, une cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par les macrophages est également surexprimé. Le maximum de sa surexpression se situe à 7 heures (facteur 5 d'augmentation), puis diminue à 24 heures et 44 jours de traitement.

- L'expression de la protéine de résistance Lrp/Mvp est également induite (d'environ trois à 5 fois) dans le foie.

- On peut également noter la surexpression d'un cytochrome p450 (Cyp1a1) qui augmente d'un facteur 2-3 tout au long du traitement.

- Enfin la glutathion-S-transférase Gstm3 est également surexprimée. La plus forte surexpression étant 24 heures après l'injection (7 fois).

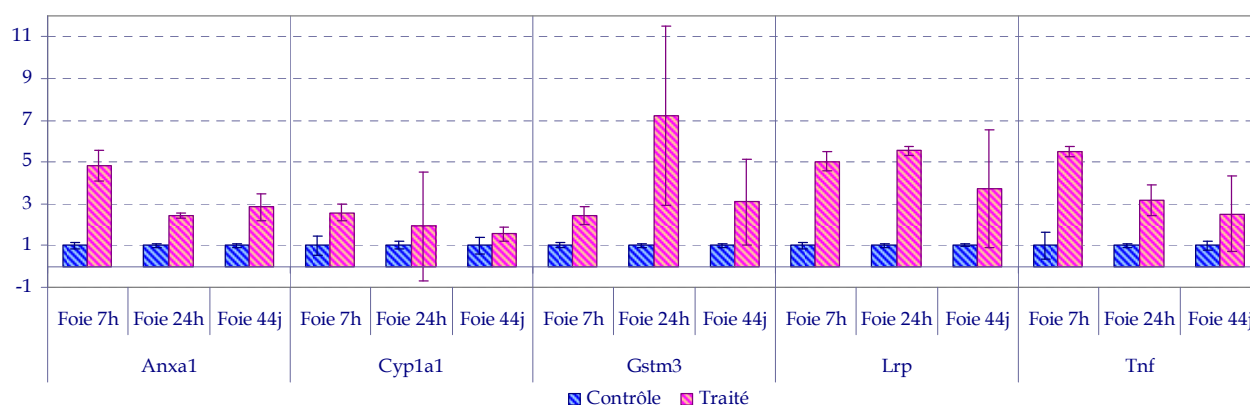


Figure 35 : Augmentation de l'expression de transcrits dans le foie de souris traitées par de la colchicine

Un transcrit subit une diminution d'expression suite au traitement, et ce aux trois temps d'incubation. Il s'agit du canal Sodium ENaC (Figure 36).

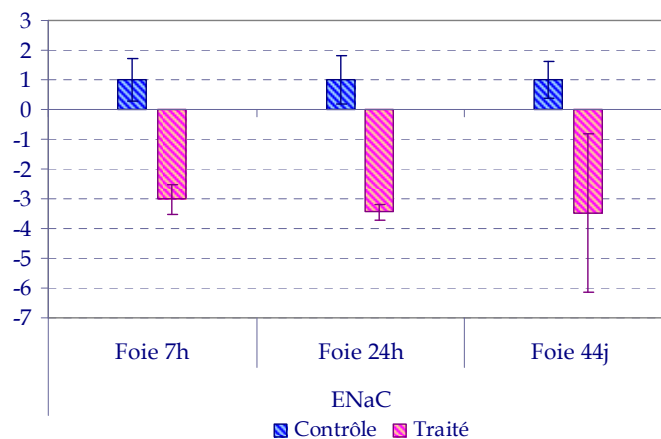


Figure 36 : Diminution de l'expression d'un transcrite dans le foie de souris traitées par de la colchicine

Variations mesurées dans le pancréas à 44 jours de traitement

Dans le pancréas, nous avons analysé le temps long d'exposition (44 jours). Un seul transporteur ABC a une augmentation d'expression significative. Abcd2 augmente de près de 4 fois ; mais également l'annexine 1 et le Tnf qui sont surexprimés d'environ un facteur 3 (Figure 37). On peut noter que les variations de ces 3 gènes ont déjà été observées dans le foie des souris traitées.

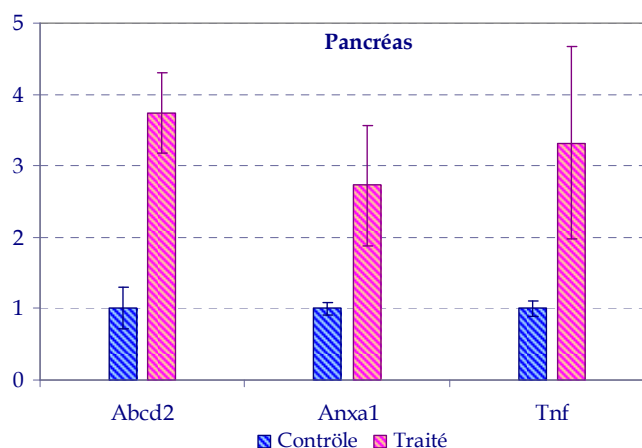


Figure 37 : Augmentation de l'expression de transcrits dans le pancréas de souris traitées par de la colchicine (44 jours de traitement).

2.6 Dans l'intestin

Variations mesurées dans l'intestin

Dans l'intestin les variations que l'on observe sont obtenues aux temps courts de traitement 7 heures et 24 heures. En dehors de la variation d'expression d'Abcb1b dans cet organe (décrite Figure 32), nous n'avons pas observé d'autres variations d'expression de transporteurs ABC. L'expression de l'annexine 1 augmente d'environ 2 fois à ces deux temps. L'expression d'une cytokine augmente elle de près de 20 fois à 7heures et 24 heures ; il s'agit de la protéine chimio-attractrice monocytaire-1 (Mcp-1/Ccl2). Enfin, l'antagoniste du récepteur à l'interleukine 1 (Il1rn) est très fortement exprimé (80 fois) après 7 heures. Il reste surexprimé à 24

heures, mais l'augmentation de son expression est nettement moins spectaculaire (environ 10 fois) (Figure 38).

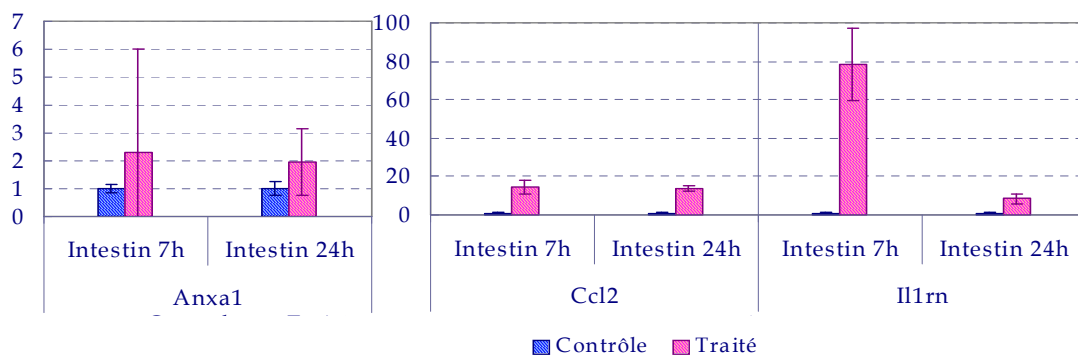


Figure 38 : Augmentation de l'expression de transcrits dans l'intestin de souris traitées par de la colchicine.

Variations d'expression dans le poumon de souris traitées par la colchicine

Dans le poumon, nous voyons des variations d'expression uniquement à 7 heures et 24 heures après l'injection (Figure 39), cependant peu de gènes semblent affectés par le traitement. Néanmoins, il est intéressant de noter que le seul transporteur ABC surexprimé est *Abcb1b*, dont l'expression est 3 fois plus forte dans les poumons de souris traitées après 7 heures de traitement. Un autre transporteur varie également, mais cette fois-ci est réprimé suite à ce traitement ; il s'agit d'*Abcg3* dont l'expression diminue d'environ 6 fois. Ce transporteur n'a actuellement pas d'homologue décrit chez l'homme et sa fonction chez la souris est encore inconnue. Néanmoins, nous avons remarqué que ce transporteur est plus exprimé dans le poumon que dans les autres tissus testés. Enfin deux cytokines pro-inflammatoires sont surexprimées : l'*Il1b* (5 fois) et le *Tnf* (2 fois).

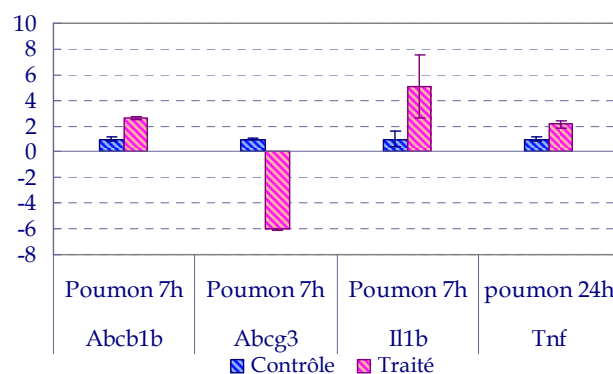


Figure 39 : Variation de l'expression de transcrits dans le poumon de souris traitées par de la colchicine.

IV DISCUSSION

Une nouvelle approche thérapeutique proposée pour la mucoviscidose serait de compléter l'absence de CFTR/ABCC7 par d'autres protéines ABC dont l'expression est induite par des drogues connues (Lallemand *et al.* 1997; Altschuler 1998). Certains produits très toxiques, tels que les antitumoraux peuvent induire des transporteurs ABC ; d'autres, comme la colchicine, peuvent aussi être de bons inducteurs. Des études cliniques utilisant la colchicine ont été réalisées sur des patients atteints de mucoviscidose et montrent une amélioration des symptômes chez ces patients (Sermet-Gaudelus *et al.* 1999; Witko-Sarsat *et al.* 1999).

Dans le cadre de l'hypothèse de complémentation de CFTR/ABCC7 par d'autres transporteurs ABC, nous avons étudié *in vivo* et *in vitro* l'effet de la colchicine sur l'expression de l'ensemble des transporteurs ABC.

La colchicine est un substrat connu du transporteur ABCB1. Des travaux ont montré que les niveaux d'expression de cet ABC corrént directement avec la résistance à la colchicine des cellules (Juliano and Ling 1976; Ambudkar *et al.* 1999). Il a d'ailleurs été montré que la colchicine est un inducteur de l'expression d'ABCB1 dans des cellules exprimant constitutivement CFTR (Breuer *et al.* 1993).

De plus, deux études récentes ont étudié *in vitro* l'effet de la colchicine sur le transporteur ABCB1 dans des lignées cellulaires déficientes en CFTR :

Dragomir et collaborateurs ont utilisé des lignées cellulaires épithéliales bronchiques (CFBE41o-) et sous-mucosales (CFSMEo-) isolées de patients atteint de mucoviscidose (Dragomir and Roomans 2004). Ces lignées ont été rendues résistantes à 4nM de colchicine. Ils notent une augmentation de l'expression de la protéine ABCB1, mais pas de changement d'expression ni de localisation de la protéine CFTR. Ils ont également observé une augmentation de l'efflux de chlore intracellulaire qui ne dépend pas de CFTR.

La deuxième équipe a utilisé des lignées de cellules épithéliales de trachée issues de patients atteints de mucoviscidose (Σ CFTE296) qu'ils ont rendues résistantes à 50nM de colchicine (Naumann *et al.* 2005). Ils observent une augmentation de la présence d'ABCB1, et précisent une absence de variation d'ABCC1.

Ces deux équipes concluent que, bien que non testée, l'expression d'autres transporteurs qu'ABCB1 est probablement induite suite à l'exposition à la colchicine.

Nous avons donc voulu connaître les transporteurs ABC qui peuvent être induits par une exposition à la colchicine. Nous avons mesuré cet effet non pas sur des cellules résistantes, mais sur des lignées sensibles mises en présence de colchicine pendant 2 à 3 jours.

Nous avons montré que sur ces temps courts d'exposition, ABCB1 est induit sur les deux types cellulaires utilisés. Dans l'une des deux lignées, ABCB1 n'est pas le seul transporteur à être surexprimé. Nous avons quantifié l'augmentation de trois autres transporteurs ABC appartenant à la sous famille A : ABCA1, ABCA6 et ABCA9. Leur augmentation corréle avec la concentration du cytotoxique. ABCA6 et ABCA9 n'ont pas de fonctions connues mais seraient impliqués dans l'homéostasie lipidique des

macrophages. ABCA1 est impliqué dans le transport de phospholipides et de cholestérol (Zarubica *et al.* 2007). Ces trois transporteurs ne semblent donc pas à priori pouvoir assurer une fonction similaire à l'activité de CFTR. Cependant, on sait maintenant que la composition en lipide de la membrane cellulaire peut jouer un rôle dans la régulation de l'activité de certains transporteurs ABC, comme par exemple ABCB1 (Le Moyec *et al.* 2000; Luker *et al.* 2000; Pallares-Trujillo *et al.* 2000; Rothnie *et al.* 2001; Troost *et al.* 2004). ABCB1 transporte une grande variété de substrats, il pourrait donc effluer des substrats habituellement transportés par CFTR. Au vu de nos résultats, il nous semble donc que si un transporteur ABC inductible par la colchicine, peut assurer une fonction de type « CFTR-like », ABCB1 est le meilleur candidat.

Nous avons ensuite voulu voir l'incidence d'un traitement colchicine *in vivo*. Nous avons utilisé comme modèle la souris et nous avons observé cet effet sur différents organes qui sont affectés dans la mucoviscidose. Ces souris ont été injectées en intrapéritonéale avec de fortes doses de colchicine et nous avons mesuré l'effet de ce traitement à 7 et 24 heures. Un autre lot de souris a subi un traitement à long terme (1 mois et demi) et a reçu 5 injections. Par ces traitements nous avons évalué l'effet de la colchicine sur 4 organes différents. Nous avons quantifié, dans ces échantillons, l'ensemble des transporteurs ABC, mais également d'autres gènes impliqués dans l'inflammation, la détoxification, le transport de sodium et de chlore, qui pourraient jouer un rôle important dans le cadre de la mucoviscidose (Tableau 9).

La première observation est que la colchicine module l'expression de cytokines pro ou anti-inflammatoires. En effet, l'expression de 2 cytokines anti-inflammatoires augmente dans plusieurs organes : l'annexine 1 dans le foie, l'intestin et le pancréas ; l'antagoniste du récepteur à l'Il1 (Il1rn) dans le foie et l'intestin. Cependant des cytokines pro-inflammatoires sont également exprimées : Il1b dans le foie, l'intestin et le poumon ; Ccl2 dans l'intestin et le Tnf dans le pancréas, le poumon et le foie. La variation d'expression de molécules intervenant dans le processus de l'inflammation est attendue lors d'un traitement utilisant la colchicine qui possède des propriétés anti-inflammatoires connues. L'inflammation est un phénomène constitutif de la mucoviscidose dans laquelle un déséquilibre de la balance des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est observé. Nous avons testé l'expression de 6 gènes impliqués dans l'inflammation. L'expression de 5 de ces gènes est affectée par ce traitement dans nos résultats. Cependant, la réponse inflammatoire est un processus très complexe faisant intervenir de nombreuses autres molécules pour lesquelles il faudrait tester l'expression afin de mieux évaluer la réponse inflammatoire au traitement colchicine.

		Foie	Poumon	Intestin	Pancréas
Transporteurs ABC	Abca5	+			
	Abca8a	-			
	Abcb1a	+			
	Abcb1b	+	+	+	
	Abcb9	-			
	Abcb10	-			
	Abcb11	-			
	Abcc1	+			
	Abcc5	+			
	Abcd1	-			
	Abcd2	+			+
	Abcg3	-	-		
	Abcg5	-			
	Abcg8	-			
	Autres transcrits	Lrp	+		
Cyp1a1		+			
Gstm3		+			
Anxa1		+		+	+
Tnf		+	+		+
Il1b		+	+	+	
Il1rn		+		+	
Clcn5		+			
NFKb1/2		+			
Rela/b		+			
Ccl2				+	
ENaC		-			

Tableau 9 : Récapitulatif des variations observées après le traitement colchicine.

En rouge sont représentés les augmentations d'expression suite au traitement ; en vert les diminutions.

Parmi ces résultats, il est très intéressant de noter que l'annexine 1 est surexprimée dans différents organes. L'annexine 1 a été proposée comme une protéine importante pour la pathologie de la mucoviscidose, probablement en relation avec ses processus inflammatoires qui ne sont pas encore bien compris. En effet, une étude récente montre que cette protéine anti-inflammatoire est absente dans des échantillons de souris *cftr^{-/-}* et qu'elle est réprimée dans des échantillons d'épithélium nasal de patients atteints de mucoviscidose (Bensalem *et al.* 2005). Si la diminution de cette protéine observée dans des échantillons de patients, a une importance dans la mucoviscidose, on peut penser que l'augmentation de son expression par un traitement colchicine pourrait être bénéfique dans le traitement de cette pathologie.

Nous avons également mesuré des variations dans l'expression de *Gstm3* dans le foie. Cette Glutathion-S-transférase, est surexprimée aux différents temps de traitement. Dans la pathologie de la mucoviscidose, de plus en plus d'arguments plaident pour un rôle important du glutathion. En effet, le taux de glutathion dans le fluide bronchique est 10 fois inférieur à la normal chez les patients. De plus, il a été

montré qu'un allèle de la glutathion-S-transférase GSTM1 avait un rôle aggravant pour la symptomatologie pulmonaire de la mucoviscidose (Baranov *et al.* 1996). Et plus récemment, une équipe a cherché des corrélations entre les polymorphismes des Glutathion-S-transférases et la sévérité de la maladie chez des enfants. Ils concluent que le polymorphisme de GSTM3 contribue à la sévérité clinique de la pathologie, mais ne voit pas d'association forte avec GSTT1, GSTM1, GSPP1 (Flamant *et al.* 2004). Dans nos études, nous avons testé ces 4 Glutathion-S-transférases et nos résultats mettent en évidence une surexpression de Gstm3 suite au traitement colchicine. Ces résultats permettent d'envisager un effet bénéfique de la colchicine par son effet inducteur de cette enzyme qui semble contribuer à la sévérité de la pathologie.

Une des variations qui nous semble également intéressante est la diminution de l'expression du canal sodium ENaC dans le foie aux 3 temps de cinétique, ce qui cependant, n'est pas observé dans le poumon. Il est connu que CFTR régule négativement l'activité du canal sodium appelé ENaC, qui est responsable de l'absorption d'ion sodium au pôle apical de la cellule épithéliale. Dans la mucoviscidose, la déficience en CFTR se traduit par une rétention intracellulaire de chlore et une hyperabsorption sodique via ENaC (Schwiebert *et al.* 1999). L'inhibition de ce canal ENaC par l'amiloride permet une meilleure hydratation des sécrétions bronchiques et une amélioration de la clairance muco-ciliaire (Hofmann *et al.* 1998). De plus, il a été montré que des cellules de l'épithélium nasal issues de patients atteints de mucoviscidose surexpriment le canal ENaC par rapport à des individus sains (Bangel *et al.* 2007). Les résultats montrant l'inhibition de l'expression d'ENaC que nous avons obtenu sur le foie laissent penser que la colchicine pourrait avoir un effet positif sur les symptômes de la mucoviscidose en limitant l'absorption de sodium par ENaC. Cependant nous n'observons pas ces variations d'expression dans le poumon.

Concernant l'expression des transporteurs ABC, l'organe pour lequel on observe le plus de variations est le foie. Sur l'ensemble des transporteurs testés, 14 transporteurs varient dont 6 montrent une augmentation d'expression. Parmi ces variations, on peut noter la surexpression d'Abcc1 et Abcc5. Ces deux transporteurs font partie de la même sous-famille que CFTR (MRP/ABCC) et pourraient jouer un rôle dans la pathologie. En effet, une étude récente a montré que dans les cellules épithéliales nasales de patients atteints de mucoviscidose, le taux d'expression d'ABCC1 et ABCC5 est moins élevé que chez des sujets sains (Hurbain *et al.* 2003). De faibles niveaux de transcrits d'ABCC1 ont aussi été associés à une maladie plus sévère (Hurbain *et al.* 2003). La surexpression de ces deux transporteurs par la colchicine pourrait donc être favorable chez des patients atteints de mucoviscidose.

En plus de la surexpression d'Abcc1, on observe dans le foie l'augmentation d'expression des transporteurs Abcb1a et Abcb1b, les deux homologues d'ABCB1. Notons qu'ABCB1 et ABCC1 sont les deux transporteurs majeurs qui ont été

proposés dans le cadre d'une complémentation de fonction avec CFTR (Lallemand *et al.* 1997).

Dans le poumon, on observe assez peu de variations d'expression. Ces traitements utilisent un cytotoxique et sont effectués en intrapéritonéale ; il semble donc normal qu'ils affectent essentiellement le foie. D'autres modes d'administration devraient peut-être être envisagés pour agir préférentiellement sur le poumon (aérosol?). Néanmoins, en dépit de cette faible réponse dans le poumon, le seul ABC transporteurs surexprimé est encore *Abcb1b*. Un seul autre transporteur est fortement réprimé, il s'agit d'*Abcg3*. Ce transporteur a une expression assez conséquente dans le poumon de souris non traitées, et il n'existe pour l'instant pas de transporteur homologue chez l'homme.

Par ces traitements colchicine nous observons la surexpression dans nos lignées cellulaires d'*ABCB1* et dans notre modèle murin celle d'*Abcc1*, *Abcc5*, *Abcb1a* et *Abcb1b*. A la lumière de ces observations, en accord avec les résultats des premiers essais cliniques, et en raison des analogies structurales et fonctionnelles entre transporteurs ABC, ces transporteurs des familles B et C sont les meilleurs candidats pour une complémentation fonctionnelle de la protéine CFTR.

V BIBLIOGRAPHIE

- Adler, Y., Y. Finkelstein, J. Guindo, A. Rodriguez de la Serna, Y. Shoenfeld, A. Bayes-Genis, *et al.* (1998). "Colchicine treatment for recurrent pericarditis. A decade of experience." Circulation **97**(21): 2183-5.
- Alarcon-Segovia, D., F. Ramos-Niembro, G. Ibanez de Kasep, J. Alcocer and R. P. Tamayo (1979). "Long-term evaluation of colchicine in the treatment of scleroderma." J Rheumatol **6**(6): 705-12.
- Altschuler, E. L. (1998). "Azithromycin, the multidrug-resistant protein, and cystic fibrosis." Lancet **351**(9111): 1286.
- Ambudkar, S. V., S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan and M. M. Gottesman (1999). "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 361-98.
- Andersen, D. and R. Hodges (1946). "Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology." Amer. J. Dis. Child. **72**(62).
- Bangel, N., C. Dahlhoff, K. Sobczak, W. M. Weber and K. Kusche-Vihrog (2007). "Upregulated expression of ENaC in human CF nasal epithelium." J Cyst Fibros.
- Baranov, V. S., T. Ivaschenko, B. Bakay, M. Aseev, R. Belotserkovskaya, H. Baranova, *et al.* (1996). "Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases." Hum Genet **97**(4): 516-20.
- Bensalem, N., A. P. Ventura, B. Vallee, J. Lipecka, D. Tondelier, N. Davezac, *et al.* (2005). "Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients." Mol Cell Proteomics **4**(10): 1591-601.
- Breuer, W., I. N. Slotki, D. A. Ausiello and I. Z. Cabantchik (1993). "Induction of multidrug resistance downregulates the expression of CFTR in colon epithelial cells." Am J Physiol **265**(6 Pt 1): C1711-5.
- Cheung, M. W. and A. C. Pugliese (1975). "The use of colchicine for the treatment of familial Mediterranean fever." J Med Soc N J **72**(9): 735-6.
- Davis, J. S. (1969). "Safety and effectiveness of colchicine by intravenous administration in the treatment of gout." J Clin Pharmacol J New Drugs **9**(6): 410-2.
- Dragomir, A. and G. M. Roomans (2004). "Increased chloride efflux in colchicine-resistant airway epithelial cell lines." Biochem Pharmacol **68**(2): 253-61.
- Fanconi, G., E. Wehlinger and C. Knauer (1936). "Das coeliakie-syndrom bei angeborenger zystischer pancreasfibromatose und bronchiectasein." Weiner Med. Wochenschr. Chnift. **86**: 753-56.
- Flamant, C., A. Henrion-Caude, P. Y. Boelle, F. Bremont, J. Brouard, B. Delaisi, *et al.* (2004). "Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis." Pharmacogenetics **14**(5): 295-301.
- Hofmann, T., M. J. Stutts, A. Ziersch, C. Ruckes, W. M. Weber, M. R. Knowles, *et al.* (1998). "Effects of topically delivered benzamil and amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **157**(6 Pt 1): 1844-9.
- Hurbain, I., I. Sermet-Gaudelus, B. Vallee, M. N. Feuillet, G. Lenoir, J. F. Bernaudin, *et al.* (2003). "Evaluation of MRP1-5 gene expression in cystic fibrosis patients homozygous for the delta F508 mutation." Pediatr Res **54**(5): 627-34.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.
- Kogan, I., M. Ramjeesingh, C. Li, J. F. Kidd, Y. Wang, E. M. Leslie, *et al.* (2003). "CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux." Embo J **22**(9): 1981-9.
- Lallemant, J. Y., V. Stoven, J. P. Annereau, J. Boucher, S. Blanquet, J. Barthe, *et al.* (1997). "Induction by antitumoral drugs of proteins that functionally complement CFTR: a novel therapy for cystic fibrosis?" Lancet **350**(9079): 711-2.
- Le Moyec, L., O. Legrand, V. Larue, M. Kawakami, J. P. Marie, F. Calvo, *et al.* (2000). "Magnetic resonance spectroscopy of cellular lipid extracts from sensitive, resistant and reverting K562

- cells and flow cytometry for investigating the P-glycoprotein function in resistance reversion." *NMR Biomed* **13**(2): 92-101.
- Luker, G. D., C. M. Pica, A. S. Kumar, D. F. Covey and D. Piwnica-Worms (2000). "Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains." *Biochemistry* **39**(29): 8692.
- Naumann, N., O. Siratska, M. Gahr and A. Rosen-Wolff (2005). "P-glycoprotein expression increases ATP release in respiratory cystic fibrosis cells." *J Cyst Fibros* **4**(3): 157-68.
- Niel, E. and J. M. Scherrmann (2006). "Colchicine today." *Joint Bone Spine* **73**(6): 672-8.
- Pallares-Trujillo, J., F. J. Lopez-Soriano and J. M. Argiles (2000). "Lipids: A key role in multidrug resistance? (Review)." *Int J Oncol* **16**(4): 783-98.
- Pelletier, P. and J. Caventou (1820). "[Examen clinique de plusieurs vegetaux de la famille des colchicees et du principe actif qu'ils enferment]." *Ann Chim Phys* **14**: 69.
- Pilewski, J. M. and R. A. Frizzell (1999). "Role of CFTR in airway disease." *Physiol Rev* **79**(1 Suppl): S215-55.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, *et al.* (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." *Science* **245**(4922): 1066-73.
- Rothnie, A., D. Theron, L. Soceneantu, C. Martin, M. Traikia, G. Berridge, *et al.* (2001). "The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence." *Eur Biophys J* **30**(6): 430-42.
- Sackett, D. L. and J. K. Varma (1993). "Molecular mechanism of colchicine action: induced local unfolding of beta-tubulin." *Biochemistry* **32**(49): 13560-5.
- Schwiebert, E. M., D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts and W. B. Guggino (1999). "CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel." *Physiol Rev* **79**(1 Suppl): S145-66.
- Sermet-Gaudelus, I., V. Stoven, J. P. Annereau, V. Witko-Sarsat, P. Reinert, M. Guyot, *et al.* (1999). "Interest of colchicine for the treatment of cystic fibrosis patients. Preliminary report." *Mediators Inflamm* **8**(1): 13-5.
- Smith, J. J., S. M. Travis, E. P. Greenberg and M. J. Welsh (1996). "Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid." *Cell* **85**(2): 229-36.
- Troost, J., H. Lindenmaier, W. E. Haefeli and J. Weiss (2004). "Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells." *Mol Pharmacol* **66**(5): 1332-9.
- Vordermark, J. S., 2nd and L. D. Hudson (1984). "Behcet disease with genitourinary involvement treated with colchicine." *Urology* **23**(3): 290-2.
- Wainwright, B. J., P. J. Scambler, J. Schmidtke, E. A. Watson, H. Y. Law, M. Farrall, *et al.* (1985). "Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22." *Nature* **318**(6044): 384-5.
- Witko-Sarsat, V., I. Sermet-Gaudelus, G. Lenoir and B. Descamps-Latscha (1999). "Inflammation and CFTR: might neutrophils be the key in cystic fibrosis?" *Mediators Inflamm* **8**(1): 7-11.
- Zarubica, A., D. Trompier and G. Chimini (2007). "ABCA1, from pathology to membrane function." *Pflugers Arch* **453**(5): 569-79.

Chapitre IV

Les transporteurs ABC au cours du développement hépatique

Chapitre IV Les transporteurs ABC au cours du développement hépatique

I INTRODUCTION

Le foie a un rôle essentiel dans l'organisme. Il est irrigué en sang artériel par l'artère hépatique et reçoit le sang provenant du tube digestif par la veine porte. Pas moins d'un litre et demi de sang traverse cet organe chaque minute. Le foie est constitué de différents types cellulaires (cellules des canaux biliaires, cellules endothéliales, cellules de küpfer (macrophage), cellules de ito), cependant 95% des cellules du foie sont des hépatocytes chez l'adulte. Les hépatocytes sont des cellules polarisées dont on distingue trois pôles :

- **le pôle sinusoïdal** (ou basal) : c'est par ce pôle que s'effectuent par la veine porte, les échanges des nutriments et xénobiotiques venant du tube digestif.
- **le pôle canaliculaire** (ou apical) qui permet l'excrétion de la bile.
- **le pôle latéral** par lequel se font les sécrétions de substances produites par les hépatocytes vers la circulation générale.

1 Le foie fœtal

1.1 Le développement du foie

Dans le fœtus humain, le foie se forme, à la 4^{ème} semaine de gestation, à partir de deux des trois tissus embryonnaires de base, le mésoderme et l'endoderme. Des plaques de 3-5 hépatoblastes se forment initialement et s'étalent en couche. Les hépatocytes se développent alors et les plaques persistent pendant la gestation et après la naissance jusqu'à la 5^{ème} année de la vie.

A partir de la 5^{ème} semaine de développement, le foie fœtal est le site d'hématopoïèse. Les canalicules biliaires se développent après la 8^{ème} semaine, à partir de cellules endodermes, entre des hépatocytes adjacents. La formation de l'arbre biliaire extrahépatique et de la vésicule biliaire est complète à la 9^{ème} semaine. La sécrétion biliaire peut être observée à la 12^{ème} semaine de gestation (Beath 2003). Histologiquement, le système biliaire n'est pas entièrement formé à la naissance et continue de se développer pendant les semaines suivantes (Van Eyken *et al.* 1988).

A la 15^{ème} semaine de développement, le foie donne progressivement le relais à la moelle osseuse pour l'hématopoïèse. A la naissance des foyers d'activité hématopoïétique persistent encore dans le foie pour laisser définitivement ce rôle à la moelle osseuse 6 semaines après la naissance.

1.2 Élimination de xénobiotiques par le foie fœtal

Pendant la grossesse, le fœtus peut être exposé à des xénobiotiques, des médicaments, ingérés par la mère. Cependant la capacité du fœtus à tolérer cette exposition est assez mal connue. En plus des effets pharmacologiques directs de ces composés, il peut y avoir des effets indirects sur le bien-être fœtal et son développement. Ces considérations s'appliquent aussi à l'exposition maternelle fortuite, à l'ingestion de composés environnementaux, de toxines et nutriments (Green *et al.* 1979 ; Juchau *et al.* 1980 ; Krauer and Dayer 1991 ; Rurak *et al.* 1991).

Il est maintenant reconnu que le métabolisme des xénobiotiques se déroule aussi dans le fœtus de mammifère (Juchau *et al.* 1980; Pelkonen 1980; Krauer and Dayer 1991 ; Rurak *et al.* 1991 ; Raucy and Carpenter 1993). Le foie semble être l'organe fœtal le plus important pour le métabolisme (Krauer and Dayer 1991). Toutefois, les capacités métabolisantes du foie fœtal restent mal comprises bien qu'elles soient d'un grand intérêt (Miners and Mackenzie 1991 ; Raucy and Carpenter 1993 ; Coughtrie *et al.* 1994).

2 Fonctions du foie adulte

2.1 Métabolique

Sur le plan métabolique, le foie assure trois fonctions vitales : une fonction d'épuration, une fonction de synthèse et une fonction de stockage.

Il contribue à maintenir une glycémie normale sous le contrôle de l'insuline. Selon le taux de glycémie dans le sang il peut stocker le glucose sous forme de glycogène (glycogénogenèse) ; à l'inverse il peut transformer le glycogène en glucose (glycogénolyse) ; mais il peut également convertir certains acides aminés et l'acide lactique en glucose lorsque le taux de glucose dans le sang est bas et que les réserves hépatiques en glycogène sont épuisées (néoglucogenèse). Le foie joue également un rôle important dans le métabolisme des lipides en participant à la synthèse de cholestérol et de triglycérides. Le foie détruit les globules rouges, synthétise l'urée afin d'excréter les déchets azotés, produit le fibrinogène utilisé dans le processus de coagulation du sang, intervient dans le métabolisme et dans le stockage des vitamines.

2.2 Production de la bile

Chaque jour, le foie fabrique un demi-litre à un litre de bile. La bile est sécrétée par les hépatocytes dans les canalicules biliaires. Elle est composée de cholestérol, de pigments biliaires et de sels biliaires. Ceux-ci, déversés dans le duodénum, émulsionnent les graisses pour favoriser leur digestion et leur absorption.

Le principal déterminant de la formation de la bile est un processus de filtration osmotique dû au transport actif des acides biliaires et de solutés.

Des transporteurs membranaires ABC interviennent dans la formation de la bile. L'expression de ces transporteurs membranaires est régulée par des mécanismes transcriptionnels, sous le contrôle de récepteurs nucléaires activés par des ligands dont les principaux sont les acides biliaires, stéroïdes synthétisés dans l'hépatocyte à partir du cholestérol.

2.3 Détoxication

Etant très vascularisé, le foie effectue de nombreux échanges, principalement avec le sang provenant de la veine porte. En effet, c'est cette veine qui conduit au foie le sang chargé de toutes les substances absorbées au niveau de la paroi du tube digestif. Le foie est le principal organe de détoxication de l'organisme. Il permet d'éviter l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme.

L'élimination hépatique peut se découper en quatre phases :

- **la phase 0**, correspondant à l'entrée passive ou active des xénobiotiques par des transporteurs membranaires d'influx au niveau sinusoïdal.
- **la phase I**, étape de fonctionnalisation. Les xénobiotiques sont pris en charge par des enzymes de phase I (mono-oxygénases à cytochrome P450) qui permettent la libération ou la formation de groupements réactifs.
- **la phase II**, étape de conjugaison des produits, fonctionnalisés ou non, à des molécules endogènes présentes dans le foie (comme le glutathion). Cette étape peut se faire grâce à la présence d'enzymes de conjugaison comme les glutathion-S-transférases (GST), les glucuronosyl transférases, les époxydes transférases ou encore les sulfotransférases.
- **la phase III**, permettant l'élimination de ces composés hydrophiles suite à l'intervention de transporteurs membranaires d'efflux. L'excrétion peut se faire au niveau de la membrane canaliculaire, vers la bile, ou bien au pôle latéral dans le sang pour une élimination rénale secondaire. Les transporteurs ABC participent à cette phase d'élimination.

3 Importance des transporteurs ABC dans le foie

Au niveau du foie, l'entrée des xénobiotiques dans l'hépatocyte est assurée par des transporteurs membranaires de type SLC (solute carrier) qui facilitent le transport de composés du sang à travers la membrane basale (ou sinusoidale).

Les transporteurs d'efflux appartenant à la famille des transporteurs ABC, se trouvent au pôle apical et au pôle latéral de l'hépatocyte.

Au niveau de la membrane apicale, ils vont permettre l'excrétion dans la bile de substances endogènes ou exogènes à l'organisme via le canal biliaire, ces substances seront éliminées du foie, stockées dans la vésicule biliaire et enfin excrétées dans la lumière intestinale. Les principaux transporteurs hépatiques d'efflux présents à la membrane apicale chez l'homme sont : MDR1/ABCB1, MRP2/ABCC2, BSEP/ABCB11, BCRP/ABCG2, ABCB4 (Faber *et al.* 2003 ; Small 2003 ; Chandra and Brouwer 2004). Deux héli-transporteurs, ABCG5 et ABCG8 sont également présents dans le foie (Berge *et al.* 2000). Ces deux transporteurs, qui fonctionnent en hétérodimères sont vraisemblablement présents à la membrane apicale et transportent des stérols (Elferink 2003).

Au pôle latéral, les transporteurs ABC expulsent les substances produites par les hépatocytes vers la circulation générale. Trois principaux transporteurs sont présents à la membrane latérale pour l'export de substrats ABCC1, ABCC3 et ABCC4 (Faber *et al.* 2003; Rius *et al.* 2003; Chandra and Brouwer 2004). Abcc6 a également été décrit au pôle latéral dans les hépatocytes de rat.

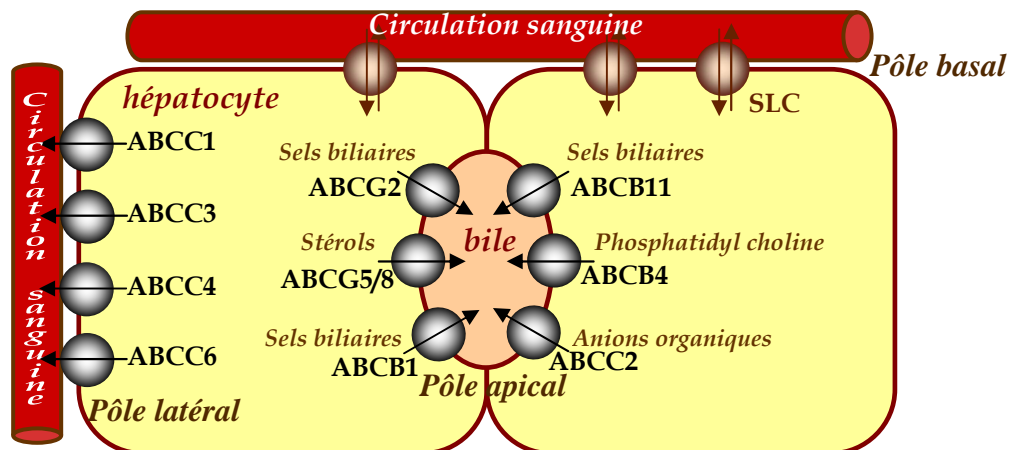


Figure 40 : Principaux transporteurs hépatiques chez l'homme.

L'entrée des xénobiotiques de la circulation porte vers l'hépatocyte est assurée par les SLC. Leur élimination et celle de leurs métabolites vers la bile impliqueraient ABCB1, ABCC2, ABCB4, ABCB11, ABCG2, ABCG5, ABCG8. Les transporteurs ABCC1, ABCC3, ABCC4, ABCC6 seraient localisés au niveau de la membrane latérale où ils interviennent dans l'élimination rénale secondaire.

L'implication de certains transporteurs ABC dans des maladies hépatiques comme les cholestases intrahépatiques familiale de type 2 (ABCB11) et 3 (ABCB4), et le Syndrome de Dubin-Johnson (ABCC2), illustre le rôle crucial des transporteurs ABC dans la fonction hépatique. Une meilleure connaissance des transporteurs que l'on sait impliqués dans la sécrétion, mais également d'autres transporteurs qui jouent peut être un rôle dans le foie permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies chez l'adulte.

Le métabolisme des médicaments par le foie fœtal n'est pas toujours bien décrit. En conséquence, la communauté médicale déconseille généralement l'utilisation de médicaments pendant la grossesse. Néanmoins, dans certains cas la prise de médicament peut être indispensable (antihistaminique, antibiotique, traitement du diabète, traitement anti-VIH...) mais peut aussi avoir des conséquences néfastes sur le développement fœtal.

Il devient donc indispensable de connaître précisément le profil d'expression au cours du développement du foie de la famille des transporteurs ABC, dont de nombreux membres jouent un rôle dans la sécrétion et l'élimination hépatique. Nous avons donc comparé les différences d'expression qui existent entre le foie fœtal et le foie adulte.

Lors de la gestation, le placenta joue un rôle de protection du fœtus face à certaines substances exogènes. Il exprime d'ailleurs certains des transporteurs en commun avec le foie. Des transporteurs pourraient être exprimés dans le placenta et le foie fœtal d'une façon coordonnée qui permettrait au placenta de compenser la maturation tardive de transporteurs dans le foie fœtal (Evseenko *et al.* 2006). Nous avons donc analysé un échantillon de placenta que nous avons comparé avec nos données obtenues sur le foie.

II RESULTATS

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Thierry Cresteil (Institut de Chimie des Substances Naturelles CNRS Gif-sur-Yvette) qui nous a fourni les ARN totaux extraits de différents types de foies humains. Nous disposons de différents types d'échantillons :

- 12 issus de **foies de fœtus** provenant d'avortements spontanés à 20 semaines de grossesse environ
- 18 échantillons de **foies de nouveau-nés** âgés de 1 à 7 jours (6 échantillons) ; 8 à 28 jours (6 échantillons) ; 1 à 3 mois (6 échantillons)
- 8 échantillons de **foies d'adultes** issus de donneurs pour transplantation d'organes

Nous avons construit une TLDA permettant de quantifier simultanément l'expression des 50 transporteurs ABC humains et 11 gènes de référence. Chaque

point de PCR a été quantifié en triplicata. Cette étude a donc nécessité plus de 7 000 réactions de PCR quantitative.

4 Choix des gènes de référence

Nous avons comparé la stabilité d'expression des 11 gènes de référence présents sur la TLDA en utilisant le logiciel GeNorm. Ce qui nous a permis de classer les gènes de référence en fonction de leur valeur de stabilité d'expression. La Figure 41 représente ce classement. Nous avons également utilisé GeNorm pour évaluer les variations par paires de nos 11 gènes de référence (Figure 42) nous permettant ainsi de choisir un nombre optimal de gènes pour la normalisation. Nous avons décidé d'utiliser la moyenne géométrique des 5 gènes de référence les plus stables : C1orf33, PPIA, TBP, AAMP et, HPRT.



Figure 41 : Stabilité d'expression des 11 gènes de référence selon GeNorm

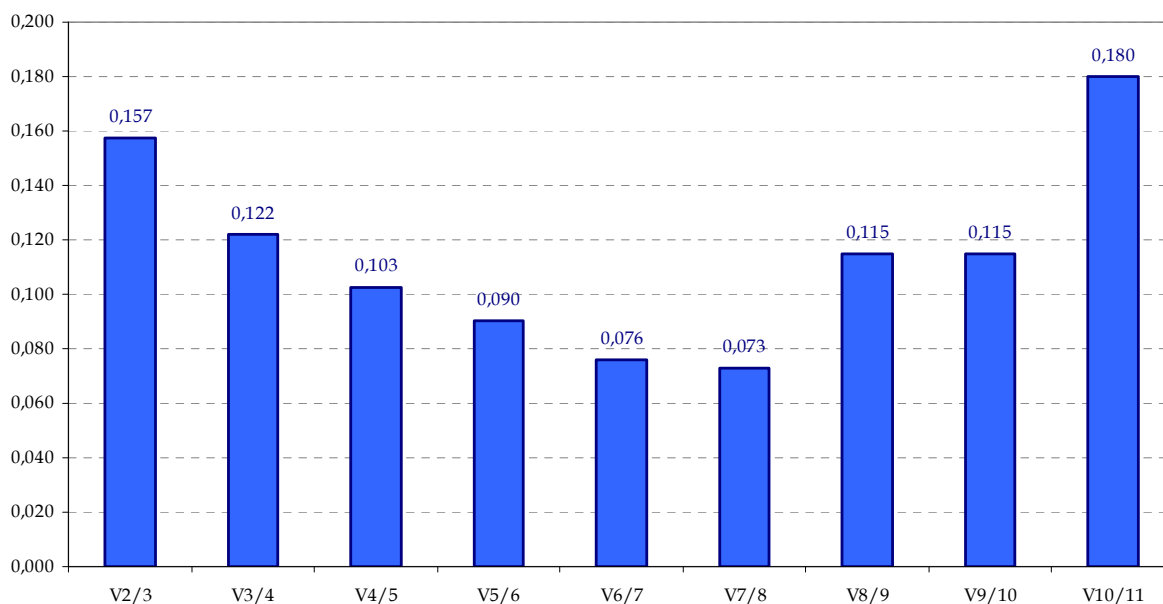


Figure 42 : Détermination du nombre optimal de gènes de référence pour la normalisation

5 Profils d'expression des transporteurs ABC

Nous avons utilisé une TLDA qui nous a permis de quantifier l'expression des 50 transporteurs ABC humains y compris ABCC13 et ABCA11 qui sont à présent décrits pour être des pseudogènes.

Afin de comparer les différences d'expression de l'ensemble des transporteurs ABC entre le foie fœtal, le foie de nouveau-né et le foie adulte, nous avons comparé les valeurs médianes des Ct normalisés de ces populations entre elles (Figure 43). Chaque cercle concentrique est séparé du suivant par 3,33 Ct soit un facteur 10 de variation d'expression. Cette représentation nous permet d'avoir une vue d'ensemble des grandes variations d'expression entre nos 3 populations.

Les transporteurs présents dans le foie qui ont été décrits dans l'introduction de ce chapitre sont entourés en rouge. Ces transporteurs sont effectivement bien exprimés dans le foie adulte, mis à part ABCC1 et ABCC4 pour lesquels on note une expression plus faible. On peut remarquer que de nombreux autres transporteurs sont également bien exprimés. Les taux d'expression les plus importants étant pour ABCA1, ABCA6, ABCD3 et ABCE1.

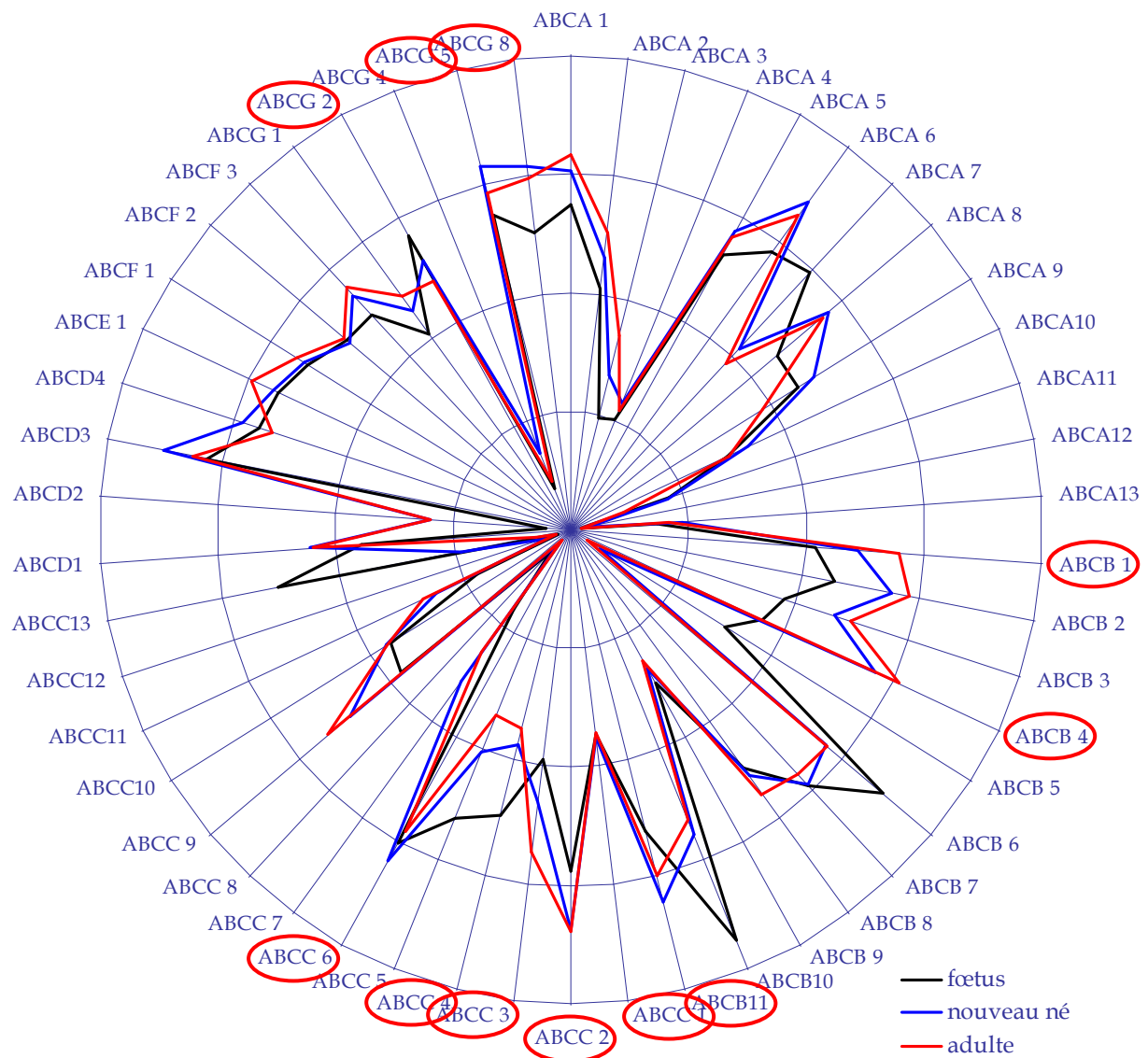


Figure 43: Expression des transporteurs ABC au cours du développement hépatique

Cette représentation nous permet de visualiser l'expression de l'ensemble des transporteurs ABC dans le foie humain à différents stades de développement : chez le fœtus, le nouveau-né et l'adulte. Les valeurs représentées correspondent aux médianes de Ct normalisés. Ces valeurs s'étendent sur une échelle 22 à 35. Sur ce graphique, chaque cercle correspond à un facteur 10 d'augmentation de concentration.

Pour analyser plus finement nos résultats, nous avons choisi une représentation qui tient compte des niveaux d'expression et nous permet de visualiser l'homogénéité (ou l'hétérogénéité) au sein d'une population.

- le foie foetal
- le foie de nouveau-nés âgés de 1 à 7 jours
- le foie de nouveau-nés âgés de 8 à 28 jours
- le foie de nouveau-nés âgés de 1 à 3 mois
- le foie adulte

A droite de chaque diagramme, un nuage de points permet de visualiser la répartition de chaque population. De gauche à droite sont représentés les

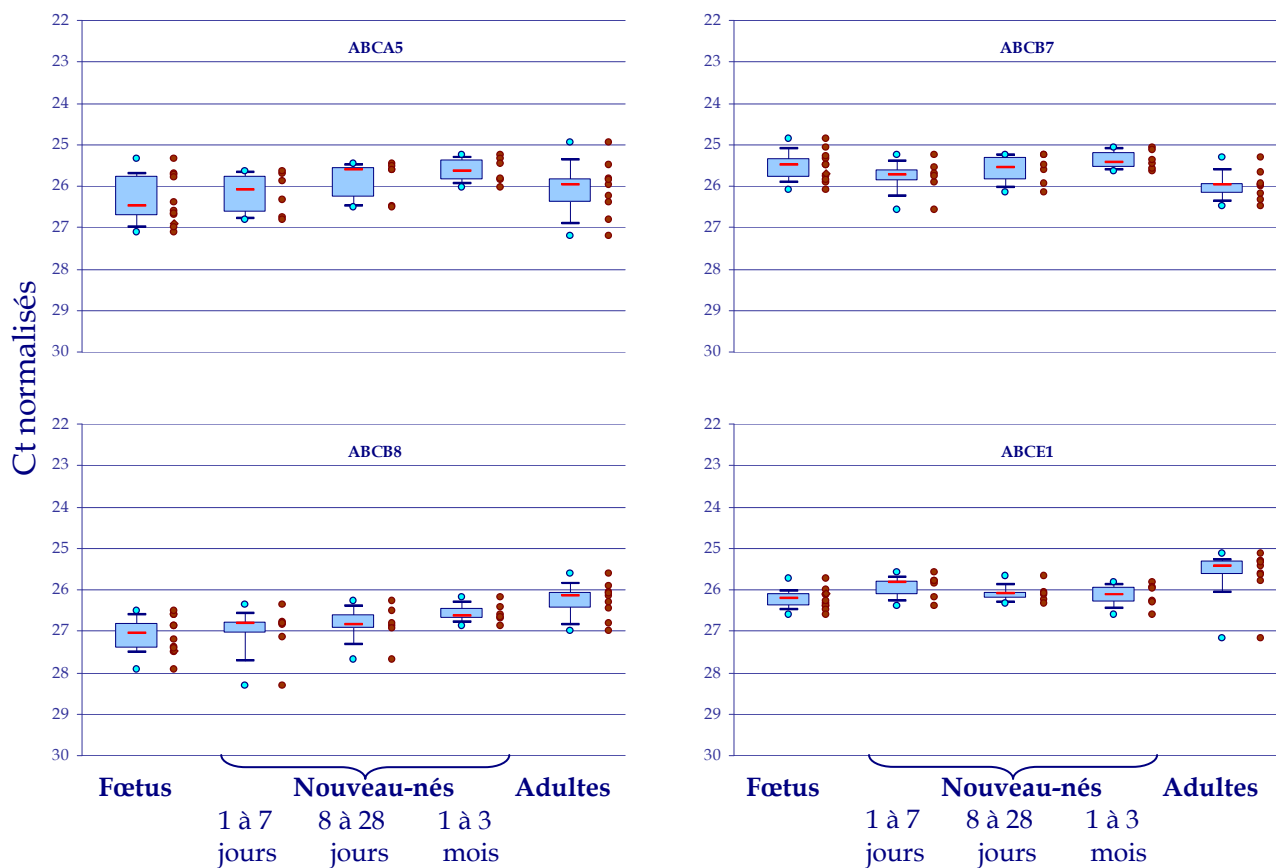
échantillons de fœtus, nouveau-nés âgés de 1 à 7 jours, nouveau-nés âgés de 8 à 28 jours, nouveau-nés âgés de 1 à 3 mois ; adultes. Dans ce chapitre nous avons représenté uniquement les transporteurs ABC dont le profil d'expression au cours de la différenciation hépatique nous paraissait intéressant. Les profils d'expression de l'ensemble des 50 transporteurs ABC dans nos 5 populations hépatiques sont représentés en Annexe de ce chapitre. Quatre profils d'expression au cours du développement hépatique se dégagent de ces diagrammes :

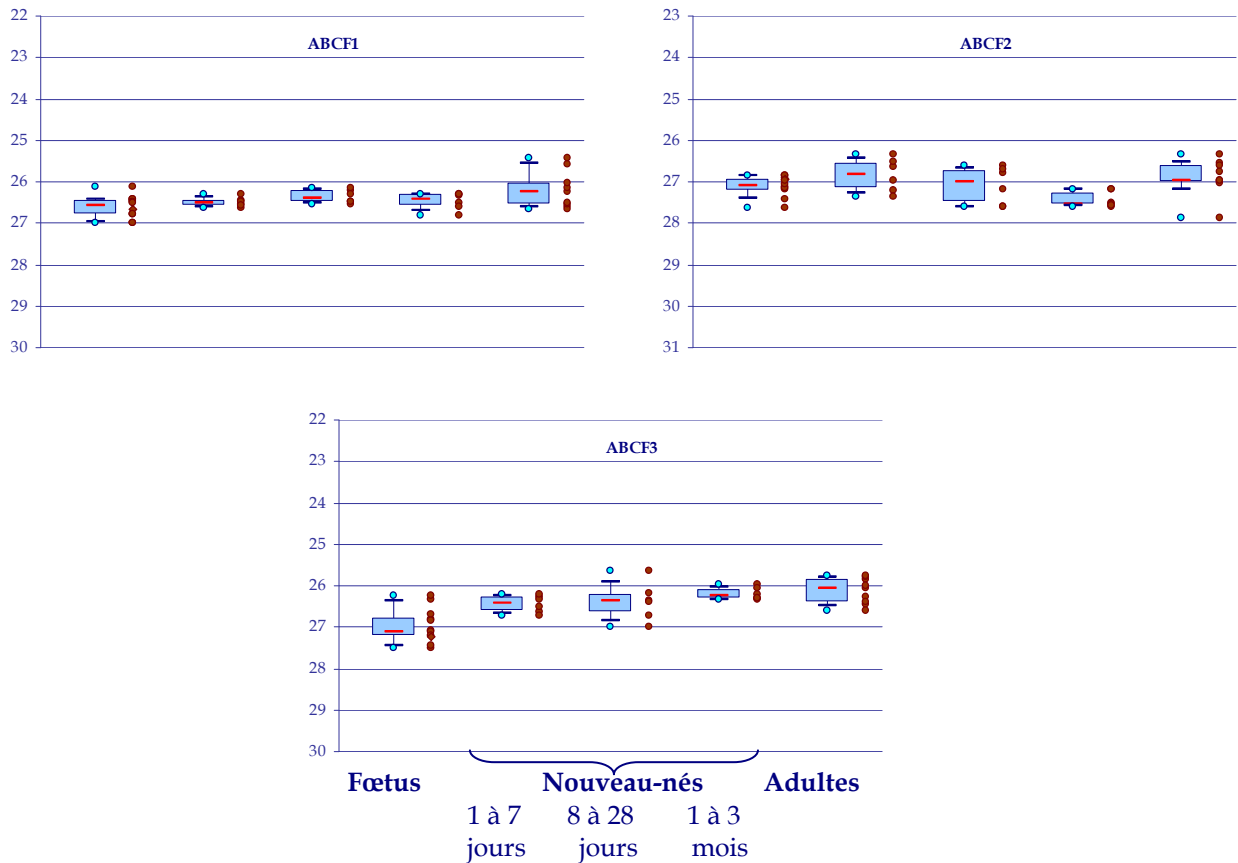
Les transporteurs ABC absents du foie

Seuls 4 transporteurs ABC sont absents de nos 5 populations de foies : ABCA12, ABCC8, ABCC12 et ABCG4. Quatre autres transporteurs sont quant à eux très faiblement exprimés dans nos 5 populations : ABCA4, ABCA11, ABCA13, ABCC11 (voir Annexe). Ces transporteurs ne sont pas décrits dans la littérature comme ayant un rôle dans le foie.

Les transporteurs ABC dont l'expression ne varie pas au cours du développement

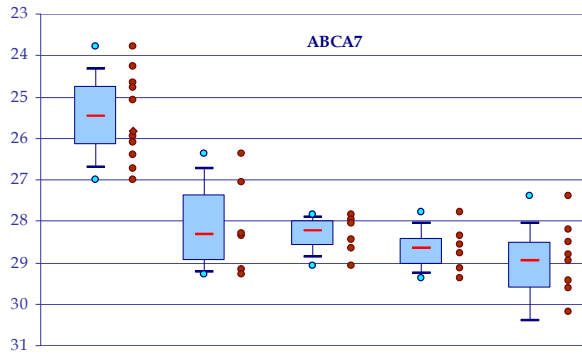
Sept transporteurs ABC sont bien exprimés dans le foie, de façon très homogène et leur expression ne varie pas ou très peu au cours du développement. Il s'agit d'ABCA5, ABCB7, ABCB8, ABCE1, ABCF1, ABCF2 et ABCF3.



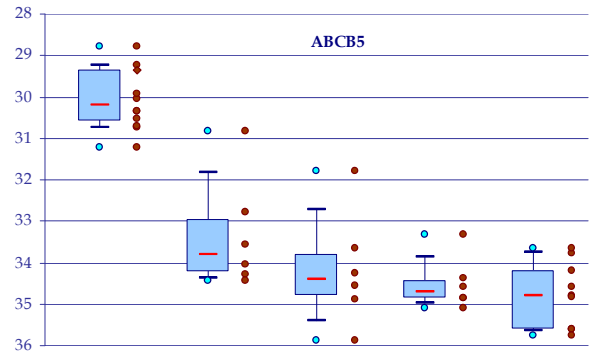


Les transporteurs ABC dont l'expression diminue après la naissance

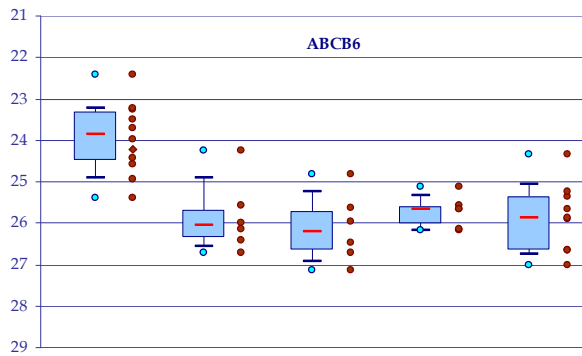
Pour certains transporteurs, leur expression dans le foie diminue fortement après la naissance. C'est le cas pour ABCA7, ABCB6, ABCB10, ABCC4, ABCC5 et ABCC13. ABCB5 est également réprimé chez l'adulte, il est toutefois assez peu exprimé chez le fœtus. Alors que l'expression d'ABCB5 et ABCC13 s'éteint chez l'adulte, on peut remarquer que le niveau d'expression des 5 autres transporteurs reste assez élevé. Pour ces transporteurs les valeurs de quantification relative (RQ) sont calculées entre la population de foie fœtal et la population de foie adulte en prenant comme référentiel le foie fœtal. Afin de vérifier si ces 2 populations étaient significativement différentes, nous avons appliqué le test de Mann & Whitney sur les valeurs de Ct normalisés. Le résultat de ce test statistique est indiqué sous chaque représentation (p).



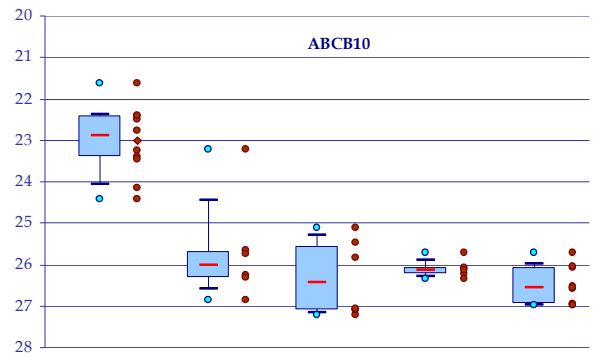
RQ -13,2 p < 10⁻⁵



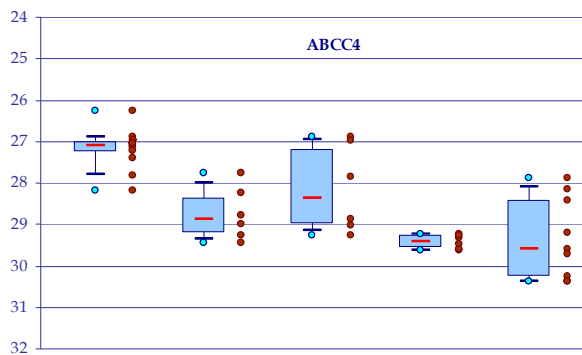
RQ -26,7 p 0,0001



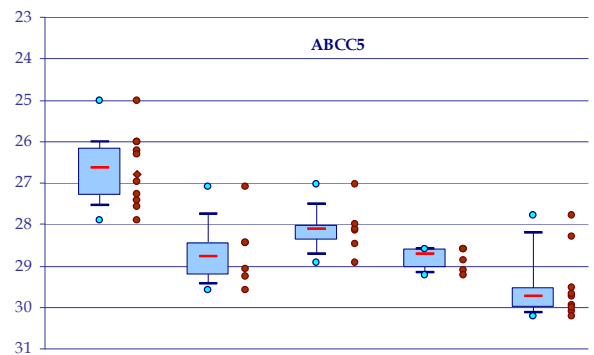
RQ -3,9 p 0,0002



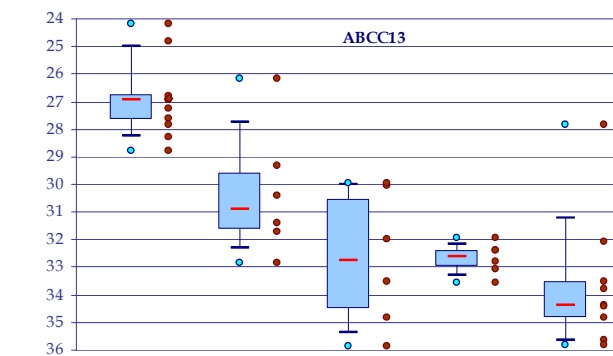
RQ -11,9 p < 10⁻⁵



RQ -4,1 p 0,0002



RQ -6,7 p 0,0002



RQ -95,2 p 0,0003

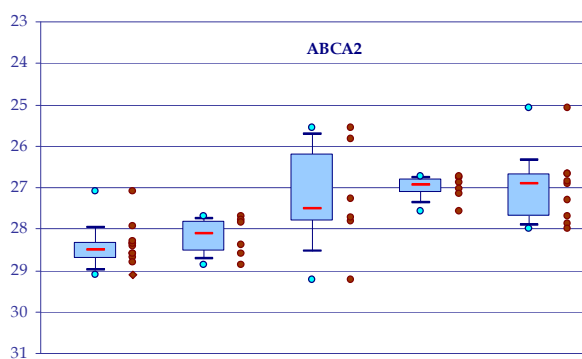
Fœtus	Nouveau-nés		Adultes
	1 à 7	8 à 28	1 à 3
	jours	jours	mois

Les transporteurs ABC dont l'expression augmente après la naissance

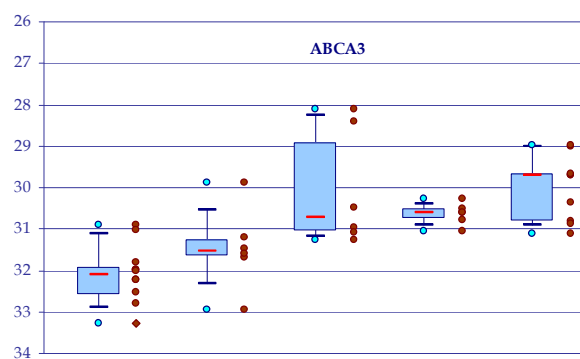
Les transporteurs ABCA2, ABCB1, ABCB2, ABCB3, ABCB4, ABCC2, ABCC3, ABCC9 et ABCD1 sont plus exprimés après la naissance. ABCA3, ABCD2 sont également plus exprimés après la naissance, mais leurs niveaux d'expression chez l'adulte restent assez faibles. De même, une augmentation de la médiane des niveaux d'expression pour ABCB11, ABCG5 et ABCG8 peut également être observée entre les fœtus et les nouveau-nés. Cependant pour ces trois transporteurs, la variabilité au sein des populations et la diminution de l'expression chez l'adulte, rendent difficile la comparaison des échantillons (voir Annexe).

Pour la plupart de ces transporteurs, leur expression est plus variable dans les populations de foies de nouveau-nés âgés de 1 à 28 jours en comparaison avec les ceux des nouveau-nés de 1 à 3 mois. ABCC9 est quant à lui variable chez le fœtus et l'adulte alors qu'ABCB1 semble plus homogène dans chaque population. Pour ces deux transporteurs ainsi que pour ABCA2 et ABCA3 on remarque que leur augmentation d'expression au cours de la maturation hépatique est graduelle au cours du temps. En revanche, pour ABCB2, ABCB3, ABCB4, ABCD1 et ABCD2, l'augmentation d'expression se produit vraisemblablement juste après la naissance et reste plus stable entre les nouveau-nés et l'adulte.

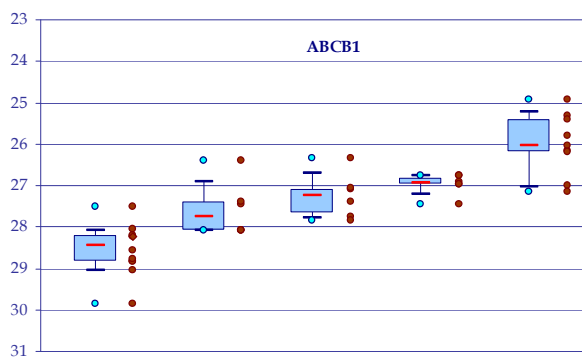
Les valeurs de quantification relative (RQ) ainsi que le résultat du test statistique (p) sont notés sous chaque représentation.



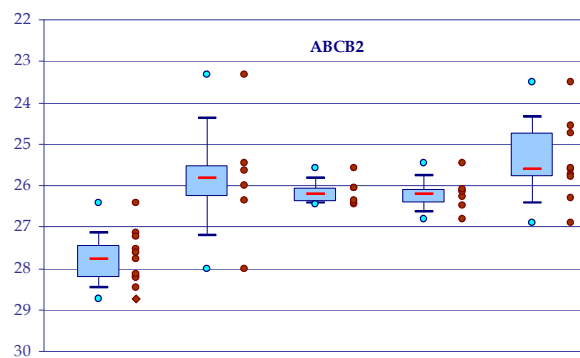
RQ 2,6 p 0,0006



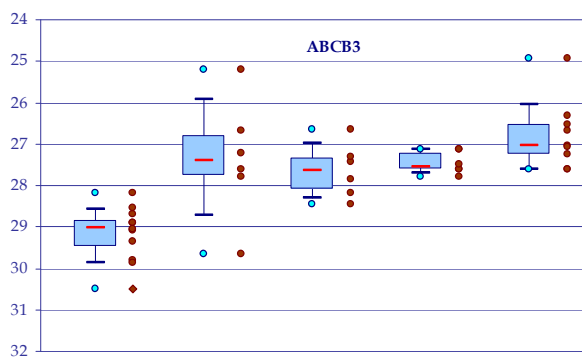
RQ 4,2 p 0,0002



RQ 5,9 p 0,0001

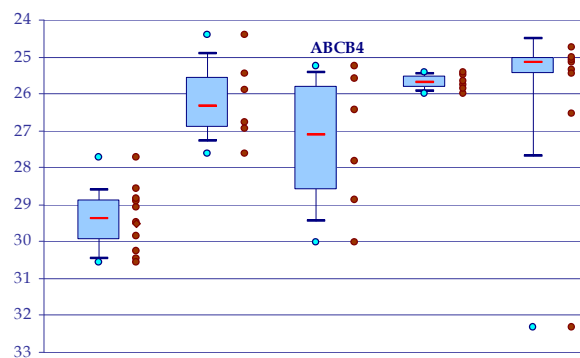


RQ 5,3 p < 10⁻⁴



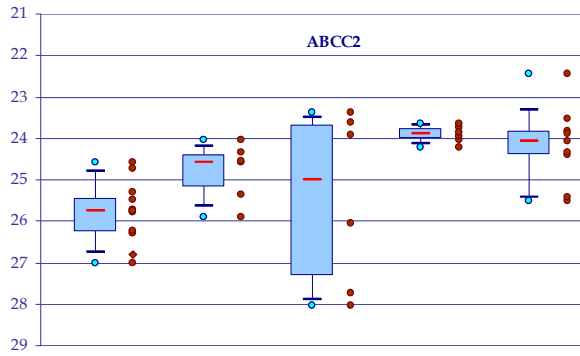
RQ 5,5 p < 10⁻⁵

Fœtus	Nouveau-nés		Adultes
	1 à 7	8 à 28	1 à 3
	jours	jours	mois

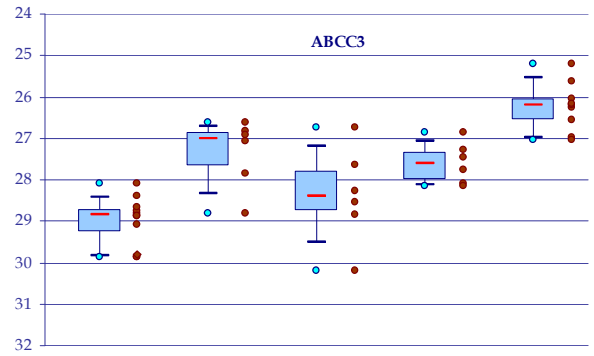


RQ 11,0 p 0,002

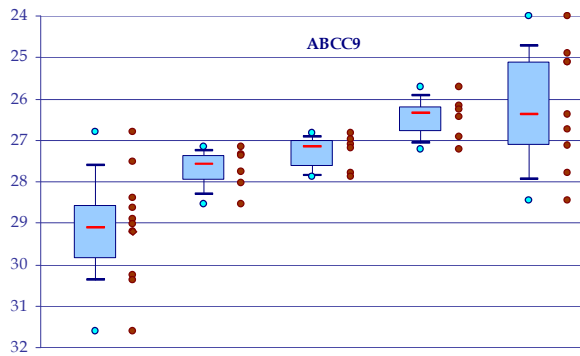
Fœtus	Nouveau-nés		Adultes
	1 à 7	8 à 28	1 à 3
	jours	jours	mois



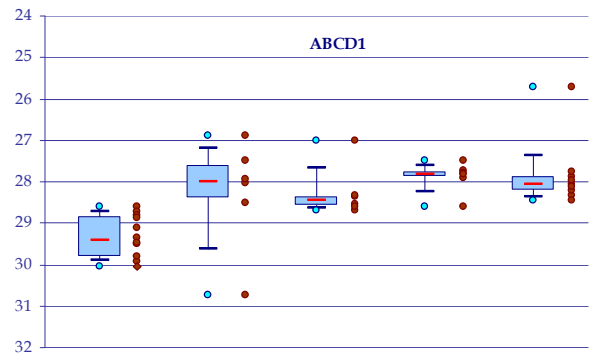
RQ 3,0 p 0,0003



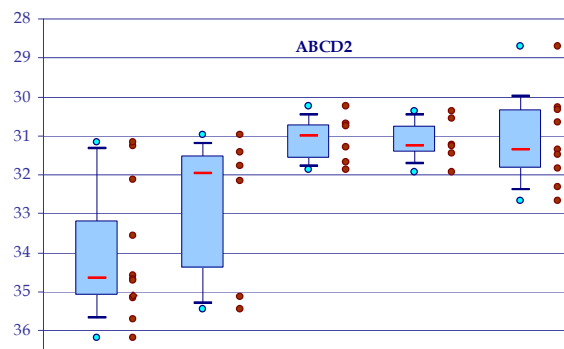
RQ 6,6 p < 10⁻⁵



RQ 6,9 p 0,0002



RQ 3,0 p < 10⁻⁵



RQ 7,9 p 0,002

Fœtus
Nouveau-nés
Adultes
1 à 7
8 à 28
1 à 3
jours
jours
mois

Certains transporteurs connus pour jouer un rôle dans le foie, notamment dans la détoxification, (comme ABCB1, ABCB4, ABCC2 et ABCC3) sont moins exprimés dans le foie fœtal. Etant donné que le foie fœtal n'assure pas seul une fonction de détoxification et que le placenta joue un rôle de barrière et peut protéger le fœtus de certaines agressions vis-à-vis des cytotoxiques, nous avons testé un échantillon commercial contenant les ARN totaux de 4 placentas que nous avons comparé à nos échantillons de foie fœtal et de foie adulte (Figure 44). Dans le placenta certains ABC sont très fortement exprimés comme ABCB2, ABCB8, ABCD1 et ABCG2. Les deux principaux transporteurs impliqués dans la détoxification (ABCB1 et ABCG2) ont un très bon niveau d'expression. De plus, certains transporteurs peu exprimés dans le foie fœtal, ont un niveau d'expression dans le placenta aussi élevé que dans le foie adulte. C'est le cas pour les transporteurs ABCA3, ABCB1, ABCB2, ABCB3 (entourés en rose).

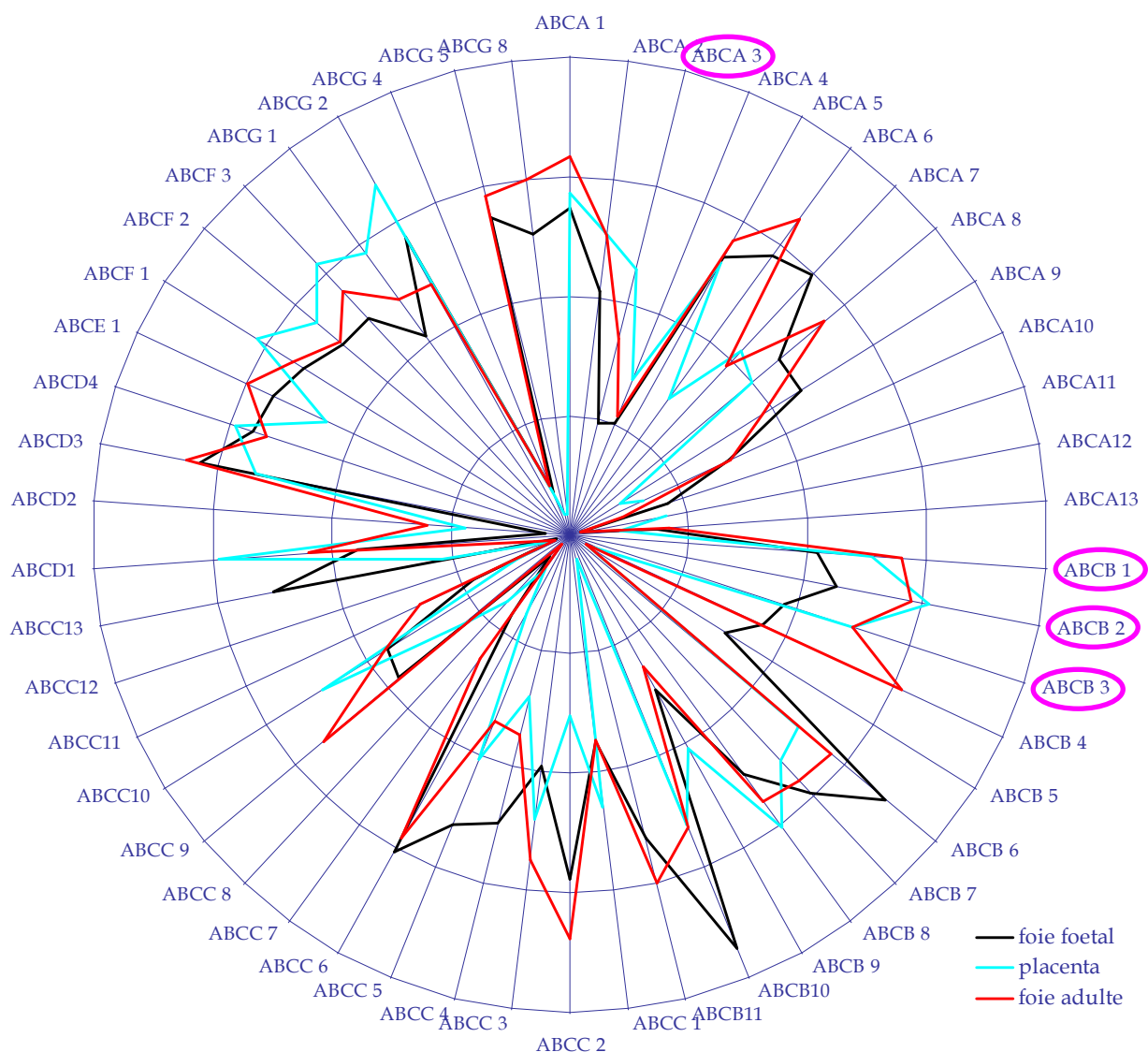


Figure 44 : Expression des transporteurs ABC dans le foie fœtal, le foie adulte et le placenta

III DISCUSSION

Nous avons mesuré et comparé l'expression des transporteurs ABC sur différents échantillons de foies humains : fœtus, nouveau-né (trois groupes d'âge) et adulte. Cette étude constitue le premier dosage des transcrits de l'ensemble des transporteurs ABC dans le foie humain à différents stades de développement. Pour ce travail, l'expression de 61 gènes différents a été quantifiée sur 38 échantillons.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce chapitre, l'étude des transporteurs ABC dans le foie humain s'est essentiellement focalisée sur le foie adulte ou des hépatocytes en culture, et s'est restreinte à l'étude des quelques transporteurs ABC hépatiques principaux. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de ces transporteurs qui sont connus pour jouer un rôle dans la fonction physiologique du foie. Lors de nos expériences, nous avons constaté que les transporteurs ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC6, ABCG2, ABCG5 et ABCG8 étaient effectivement bien présents dans le foie adulte. La plupart ont des niveaux d'expression élevés, mais ABCC1 et ABCC4 sont à des niveaux d'expression plus faibles. ABCG5 et ABCG8 qui ont été décrits dans le foie mais sont peu souvent représentés parmi les principaux ABC hépatiques, sont très bien exprimés.

On peut remarquer que globalement pour 6 des 7 transporteurs présents à la membrane apicale et pouvant intervenir dans la formation de la bile, leurs niveaux d'expression augmentent, dans les semaines ou mois suivant la naissance (ABCB1, ABCB4, ABCB11, ABCC2, ABCG5 et ABCG8). Ces variations corrélerent avec le développement de la fonction hépatique et plus particulièrement de la fonction biliaire.

Parmi les transporteurs qui seraient présents au pôle latéral des hépatocytes, ABCC1 et ABCC6 semblent assez constants alors qu'ABCC3 et ABCC4 semblent varier différemment au cours du développement : expression plus forte chez l'adulte pour ABCC3 ; expression plus importante chez le fœtus pour ABCC4. De ces 4 membres de la sous-famille C, la présence d'ABCC3 semble donc être la plus critique pour l'évolution de la fonction hépatique.

Une seule publication a décrit l'abondance de 47 des 50 transporteurs ABC par PCR quantitative dans le foie, ces résultats ont été obtenus en utilisant un échantillon commercial d'ARN (Langmann *et al.* 2003). Dans cette publication, les auteurs classent les transporteurs en 4 groupes en fonction de leurs niveaux d'abondance dans le foie.

Dans les travaux de Langmann et collaborateurs, certains transporteurs sont décrits comme étant quasiment absents du foie adulte. Nous confirmons que chez l'adulte les transporteurs ABCA4, ABCA12, ABCB5, ABCB9, ABCC12 et ABCG4 sont absents ou très faiblement exprimés. Cependant certaines différences apparaissent dans nos comparaisons avec les travaux de Langmann, en effet, dans nos expériences, les niveaux d'expression des transporteurs ABCC7 et ABCD2 sont plutôt considérés

faibles, et ceux d'ABCA7 et ABCA10 sont moyens. Enfin, pour ABCA5 que les auteurs ne détectent pas dans le foie, nous voyons un très bon niveau d'expression dans l'ensemble de nos échantillons. Ce transporteur fait d'ailleurs partie des ABC dont le taux de transcrit est le plus élevé.

En ce qui concerne les transporteurs les plus exprimés dans le foie, Langman et collaborateurs détectent trois transporteurs : ABCB4, ABCC2 et ABCG8. Dans nos expériences, ces transporteurs sont effectivement très présents dans le foie. Cependant nous voyons d'autres ABC dont l'expression semble aussi forte, il s'agit d'ABCA1, ABCA5, ABCA6, ABCB11, ABCC6, ABCD3, ABCE1 et ABCG5. On retrouve 3 des transporteurs biliaires ainsi que d'autres transporteurs qui pourraient participer aux fonctions hépatiques en assurant le transport de lipides comme ABCA1, ABCA6 et ABCD3. ABCA1 jouerait un rôle dans le transport de cholestérol dans le foie pour la sécrétion (Cavelier *et al.* 2006). ABCA6 a déjà été décrit dans le foie, et serait impliqué dans l'homéostasie lipidique (Kaminski *et al.* 2001). ABCD3 est un héli-transporteur présent à la membrane des peroxyosomes qui est détecté dans le foie (Wanders *et al.* 2007). Il a été montré *in vitro* que cet ABC pouvait transporter des Acyl-CoA à longue chaîne (Imanaka *et al.* 1999).

Enfin, ABCE1 est un ABC qui contient seulement 2 domaines de liaison à l'ATP et qui n'a vraisemblablement pas de fonction de transport. Il a initialement été identifié pour son rôle d'inhibition de la ribonucléase L (Bisbal *et al.* 1995). Néanmoins une publication a montré que ce transporteur est réprimé dans le foie de patients atteints d'hépatite C chronique (Yu *et al.* 2000).

Nous avons remarqué que l'expression de certains transporteurs variait au cours du développement hépatique. Certains sont spécifiquement exprimés dans le fœtus, d'autres apparaissent seulement après la naissance.

Nous avons vu que certains transporteurs déjà connus pour assurer des fonctions hépatiques telle que l'excrétion vers la bile ou vers la circulation augmentent après la naissance. Cependant d'autres transporteurs (ABCA2, ABCA3, ABCB2, ABCB3, ABCC9, ABCD1 et ABCD2) sont également plus exprimés après la naissance. Leur niveau d'expression laisse penser qu'ils sont importants dans le foie adulte.

On sait qu'à la naissance, le foie n'est pas totalement mature. Il est d'ailleurs fréquent de voir survenir certains problèmes hépatiques comme l'ictère du nouveau-né jusqu'à 14 jours après la naissance (Beath 2003). On peut donc penser que certains transporteurs s'expriment et deviennent effectifs dans les premières semaines qui suivent la naissance. On remarque d'ailleurs pour plusieurs des transporteurs dont l'expression augmente après la naissance, une forte hétérogénéité chez les nouveau-nés vraisemblablement au moment où la fonction de ces transporteurs devient nécessaire. L'expression de ces transporteurs se stabilise le plus souvent dans les populations plus âgées.

Concernant les profils d'expression que nous avons mesurés dans le foie fœtal, nous avons remarqué que certains transporteurs étaient exprimés préférentiellement dans le foie fœtal (ABCA7, ABCB5, ABCB6, ABCB10, ABCC4, ABCC5, ABCC13). Parmi ces transporteurs ABCC13 et ABCB5 sont uniquement exprimés dans le foie fœtal.

Chez le fœtus, le foie assure tout d'abord une fonction hématopoïétique qui laisse peu à peu la place aux fonctions métaboliques du foie adulte. Parmi les transporteurs qui sont surexprimés dans le foie fœtal, le transporteur mitochondrial ABCB10 intervient dans la biosynthèse de l'hème (Shirihai *et al.* 2000) et certaines publications ont suggéré un rôle d'ABCA7 et ABCC13 dans l'hématopoïèse (Kaminski *et al.* 2000 ; Yabuuchi *et al.* 2002).

ABCB5, ABCC4, ABCC5 ont été décrits comme assurant des fonctions de détoxification (Frank *et al.* 2005; Ritter *et al.* 2005), ABCB6 a lui été détecté dans des lignées et tissus résistants (Yasui *et al.* 2004; Park *et al.* 2006). Ces transporteurs, qui sont donc capables de transporter des substances toxiques, pourraient, dans le foie fœtal, permettre l'excrétion de substances du fœtus vers la mère.

Les fonctions de protection et d'excrétion sont également assurées en partie par le placenta. Un modèle illustrant la présence de certains transporteurs ABC dans les échanges mère/fœtus a été proposé (Marin *et al.* 2005). Ce modèle représenté Figure 45 propose un rôle aux transporteurs appartenant à la sous-famille C dans le foie fœtal qui permettraient le passage de molécules à travers la membrane basolatérale. Nos résultats suggèrent qu'ABCC4 et ABCC5 pourraient jouer ce rôle dans le fœtus. Dans le modèle de Marin et collaborateurs, les transporteurs ABCB1, ABCG2, ABCC1/2/3 qui sont exprimés dans le placenta assureraient l'export de substances vers la circulation maternelle. La forte expression d'ABCB1 et ABCG2 est compatible avec cette fonction, cependant il semble peu probable qu'ABCC2 puisse assurer cette fonction étant donné son faible niveau d'expression dans le placenta.

Nos résultats montrent que les transporteurs ABCA3, ABCB1, ABCB2, ABCB3, qui sont présents chez l'adulte et presque absents du foie fœtal, ont une expression dans le placenta au moins aussi élevée voire plus importante que dans le foie adulte. Cette forte expression au niveau du placenta pourrait donc compenser la faible expression chez le fœtus en assurant une fonction d'excrétion de certains solutés ou de xénobiotiques vers la circulation maternelle.

Cette étude sur le placenta résulte d'une moyenne obtenue avec 4 échantillons. Une étude comprenant un plus grand nombre d'échantillons serait nécessaire pour vérifier ces résultats. Une meilleure connaissance concernant le transfert et le métabolisme transplacentaire des xénobiotiques permettra de mieux connaître les conséquences de traitements pharmacologiques lors de la grossesse et de les améliorer (Syme *et al.* 2004).

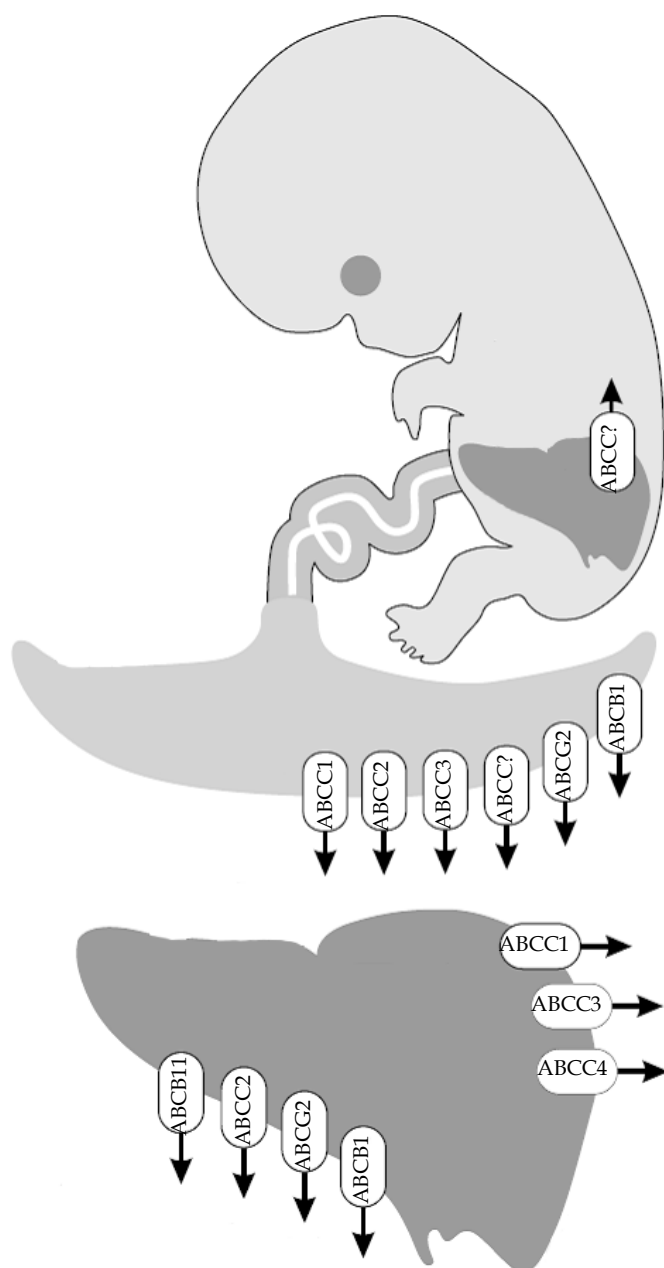
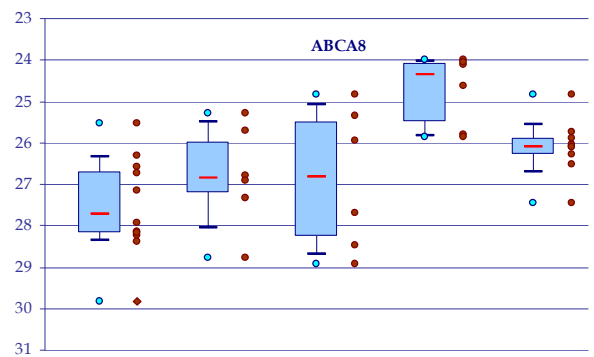
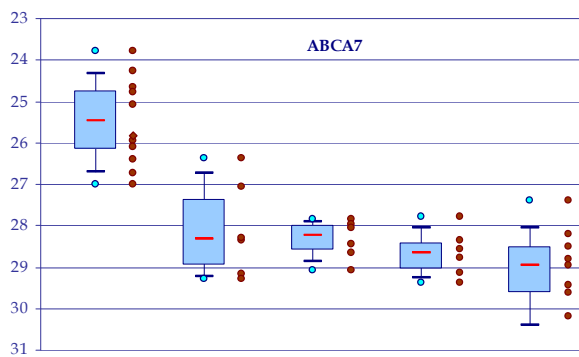
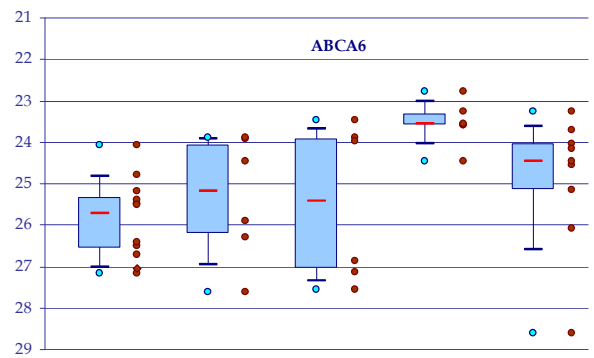
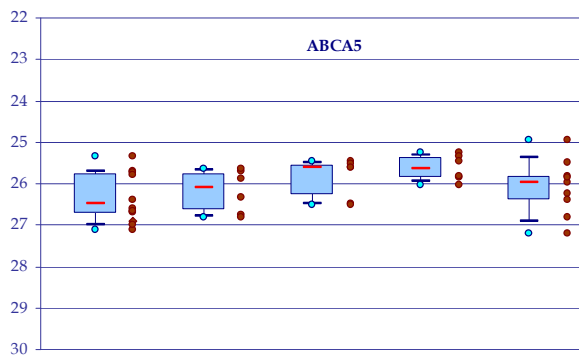
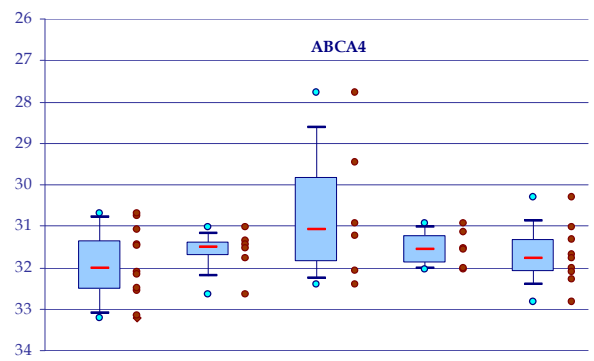
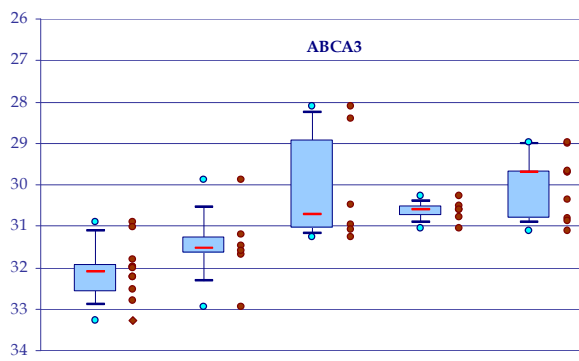
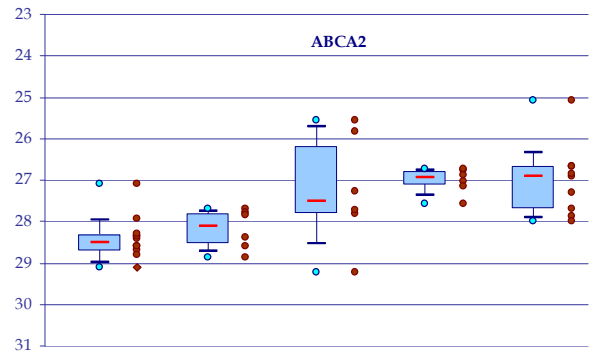
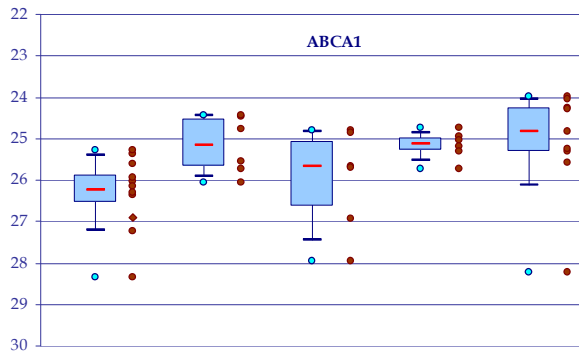
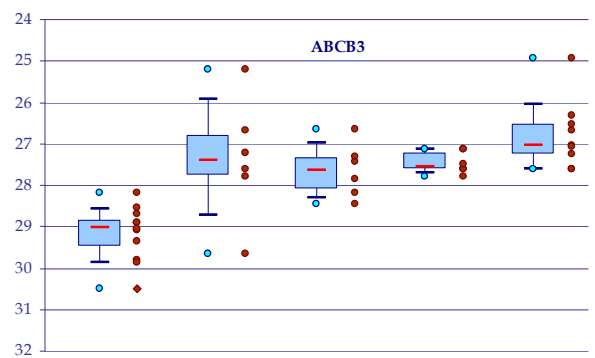
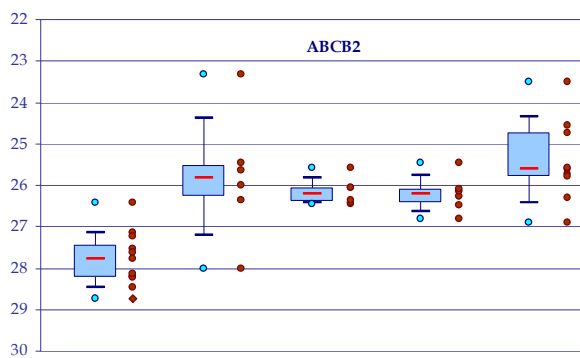
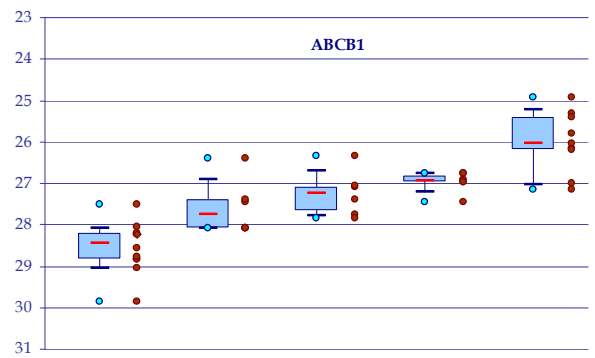
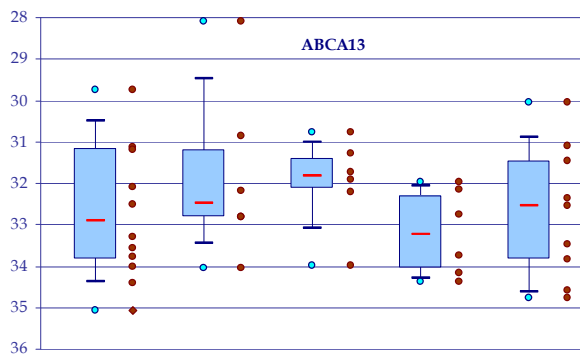
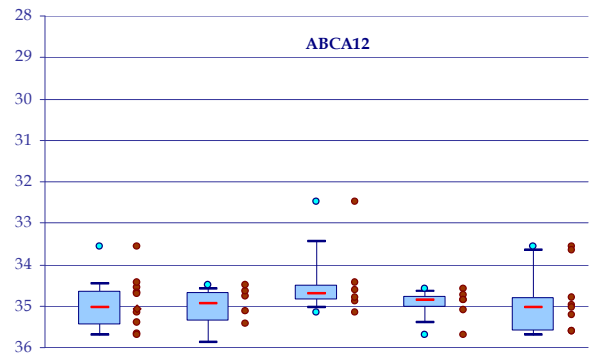
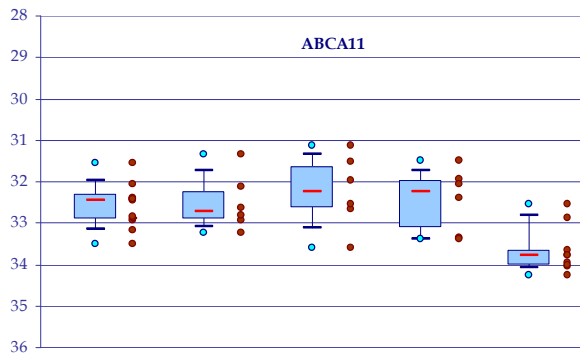
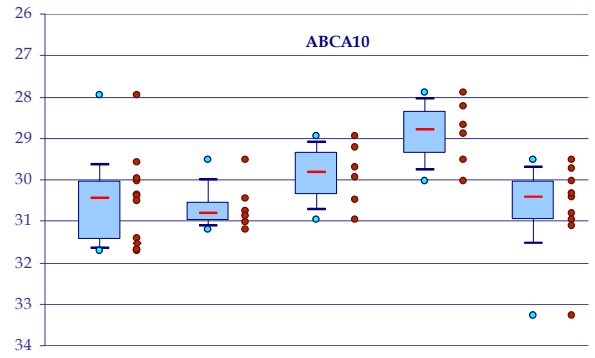
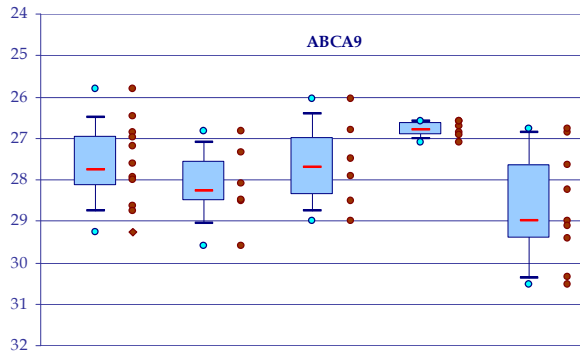


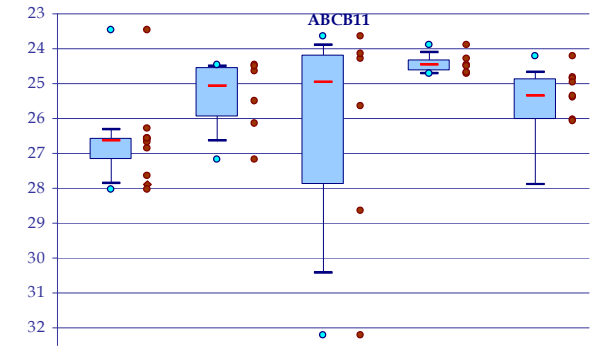
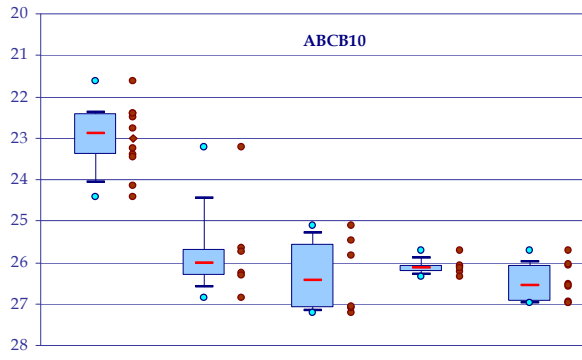
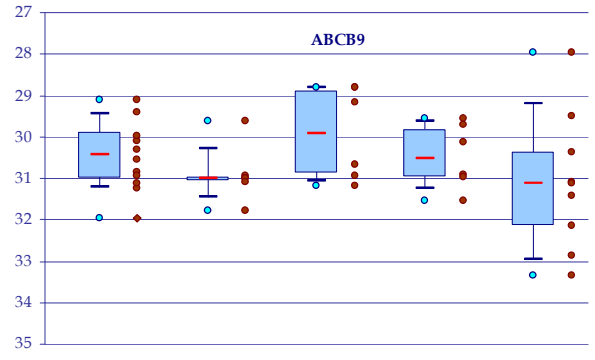
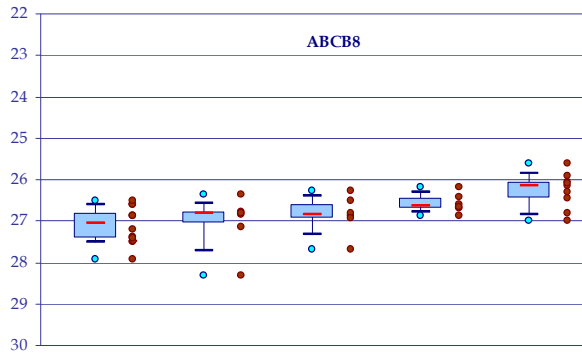
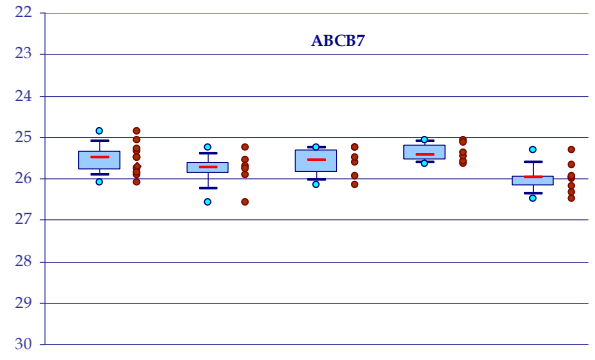
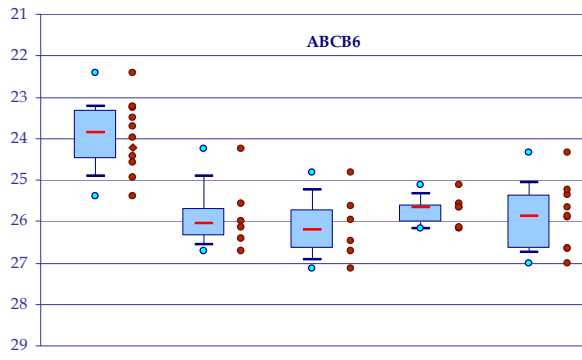
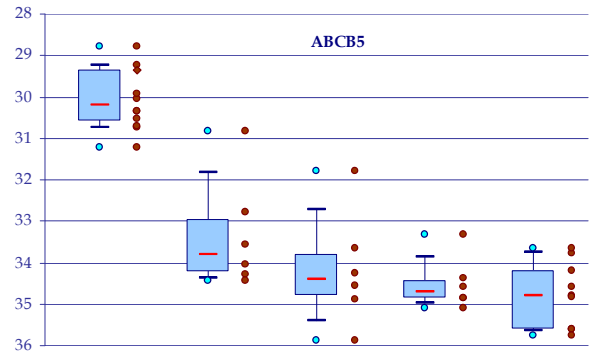
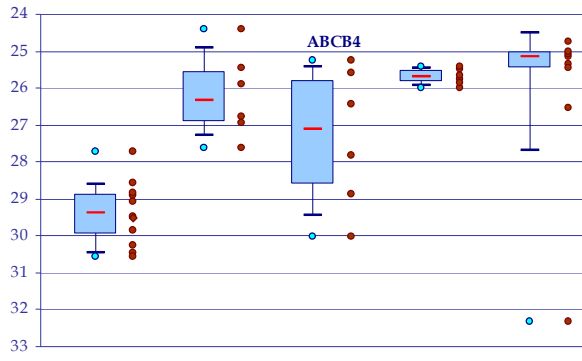
Figure 45 : Représentation schématique de la présence des transporteurs ABC dans le foie adulte et fœtal et dans le placenta. (Marin *et al.* 2005)

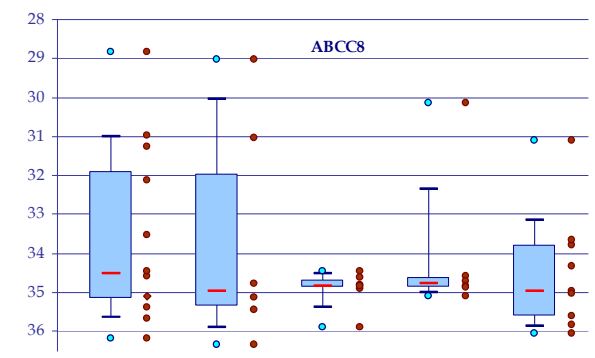
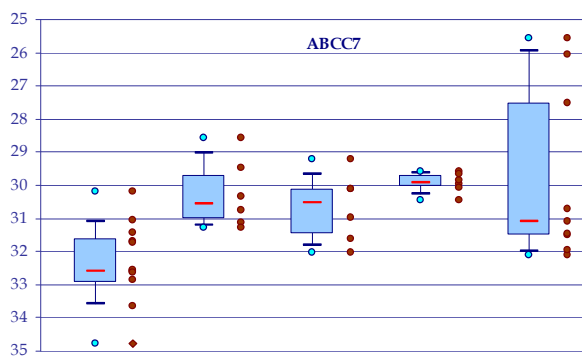
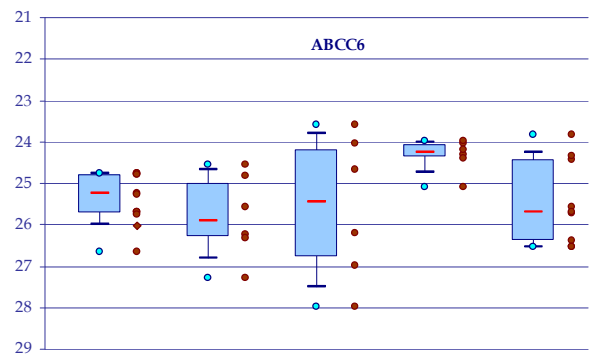
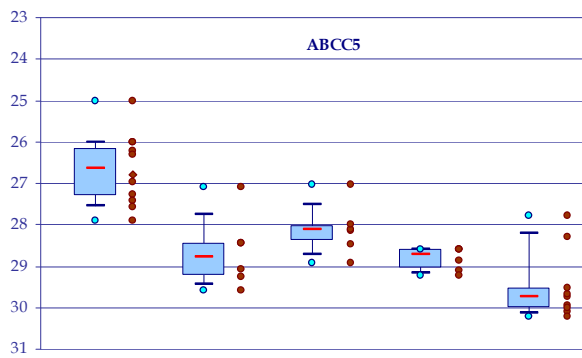
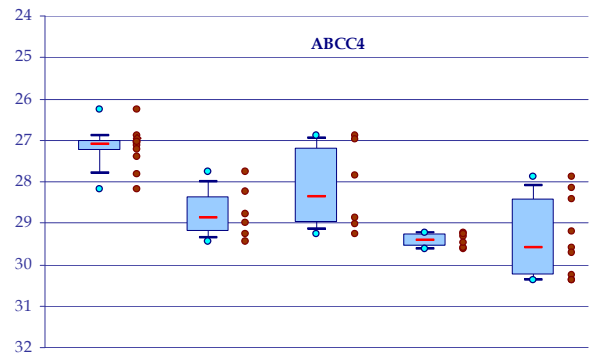
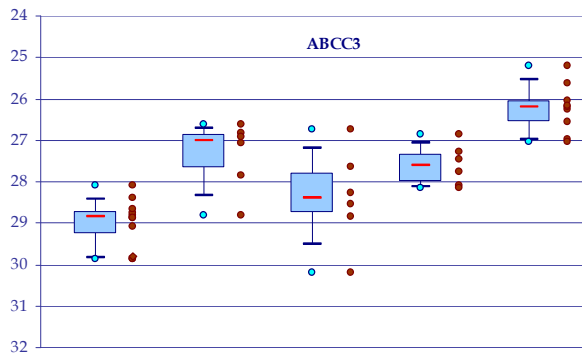
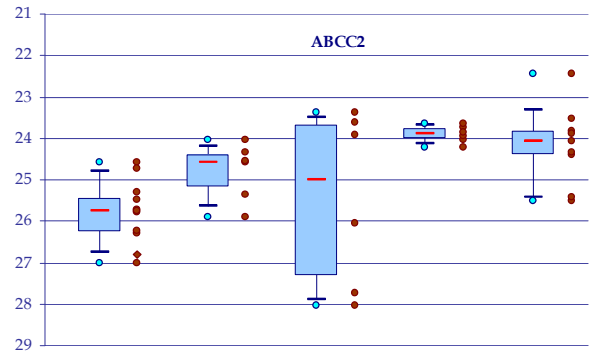
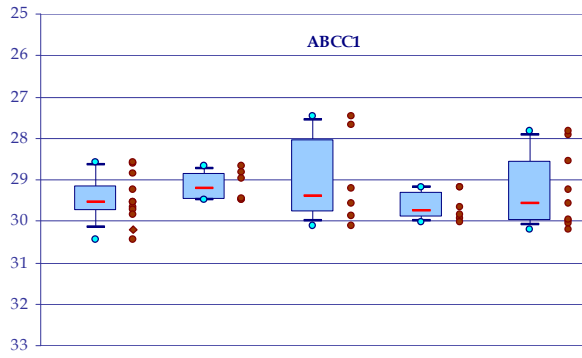
Les transporteurs ABC sont des acteurs importants dans la fonction hépatique. Plusieurs maladies hépatiques provoquées par des mutations de transporteurs ABC attestent de leur importance. Ce travail constitue la première étude quantifiant l'expression de l'ensemble des transporteurs ABC sur des échantillons de foies humains à différents stades de développement. Une meilleure connaissance de ces profils d'expression contribue à améliorer notre compréhension de la physiologie de l'excrétion hépatique, et du mécanisme de détoxication du foie.

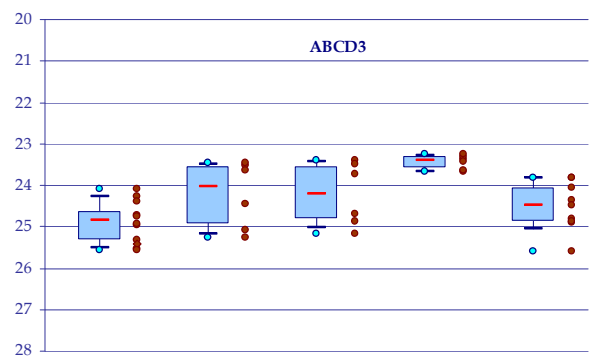
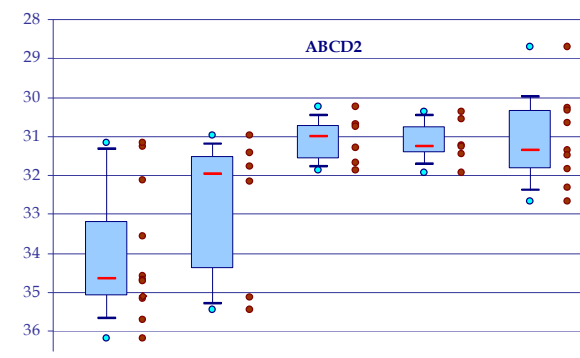
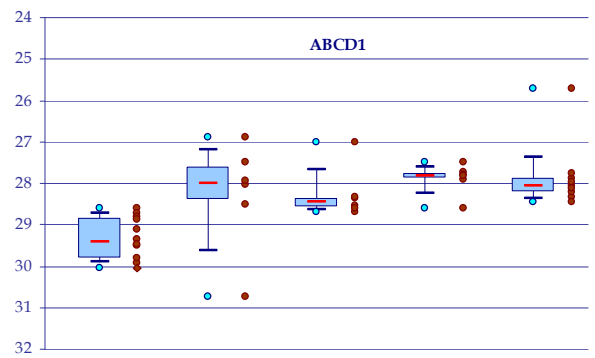
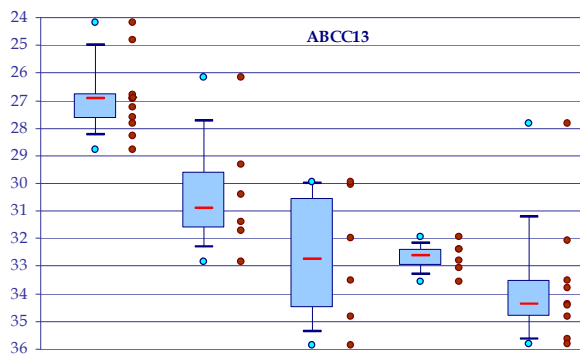
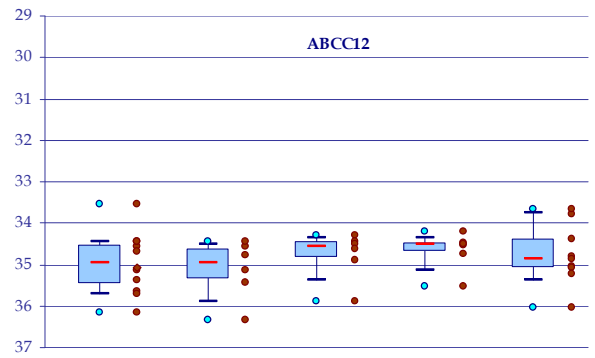
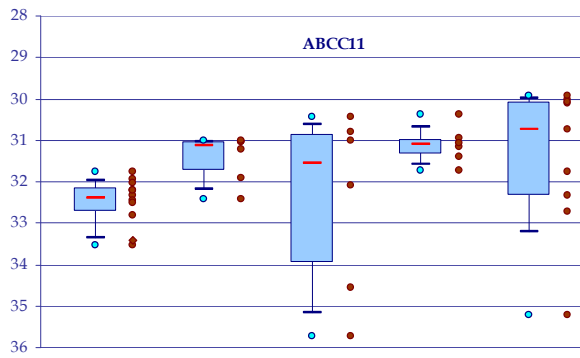
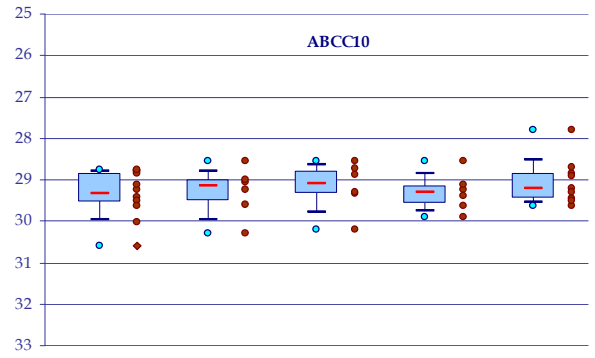
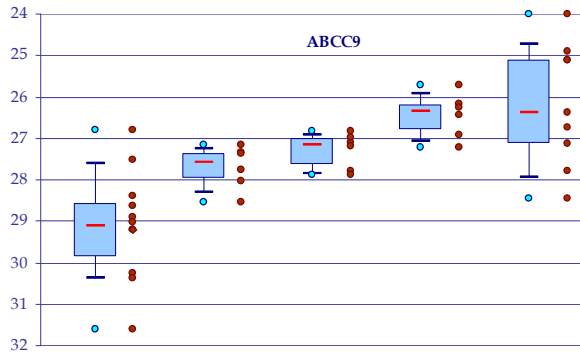
III ANNEXE 1

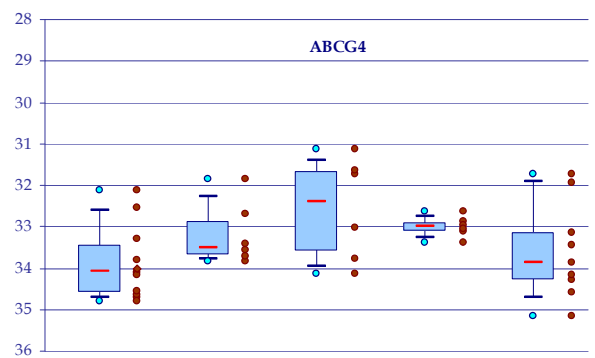
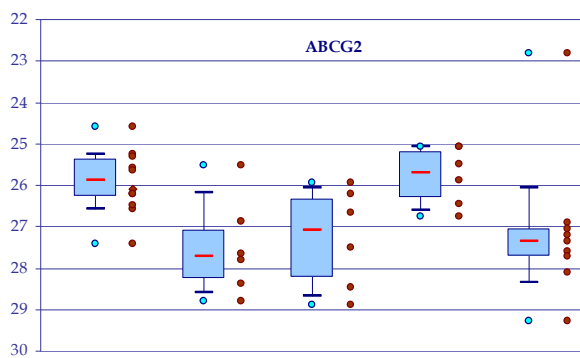
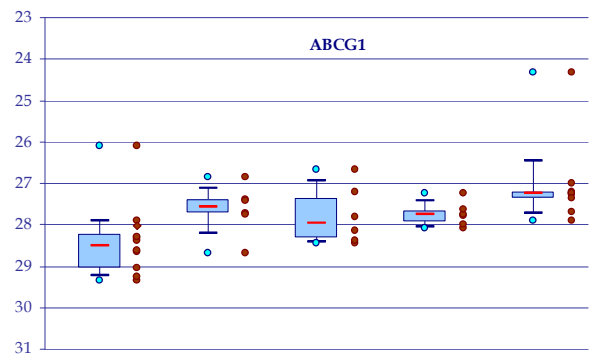
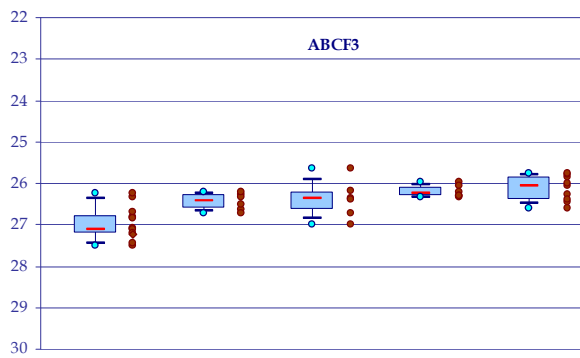
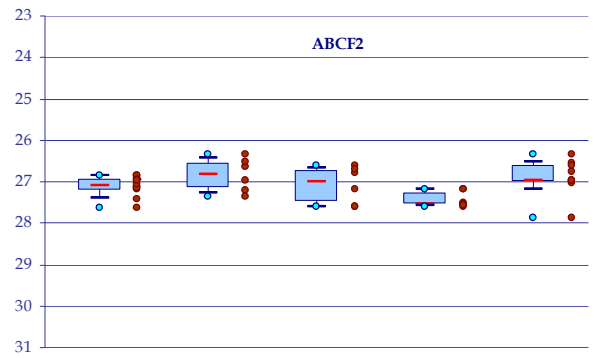
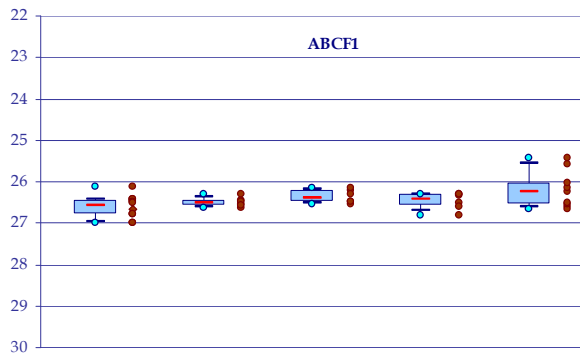
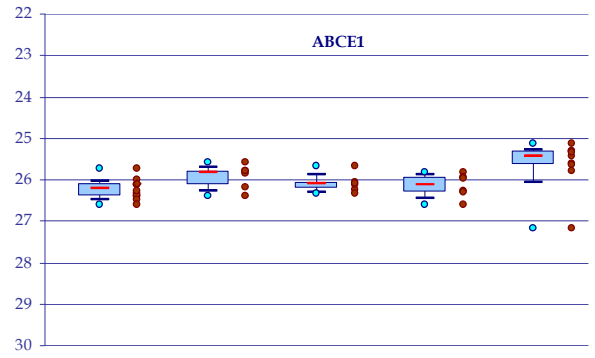
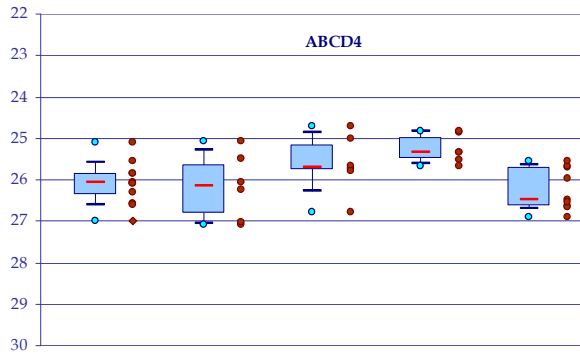


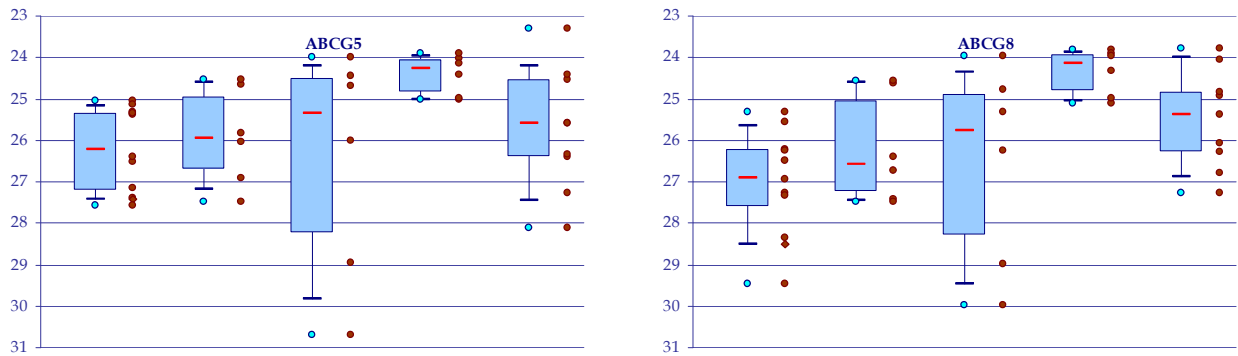












IV ANNEXE 2

L'annexe 2 représente la comparaison de l'expression des transporteurs ABC hépatiques humains et murins. Les grandes différences entre le foie humain et murin concernant leur expression en transporteurs ABC : ABCA3, ABCD1, ABCD2 et ABCD3 sont plus exprimés dans le foie murin. En revanche ABCA5, ABCB1 sont beaucoup plus présent dans le foie humain.

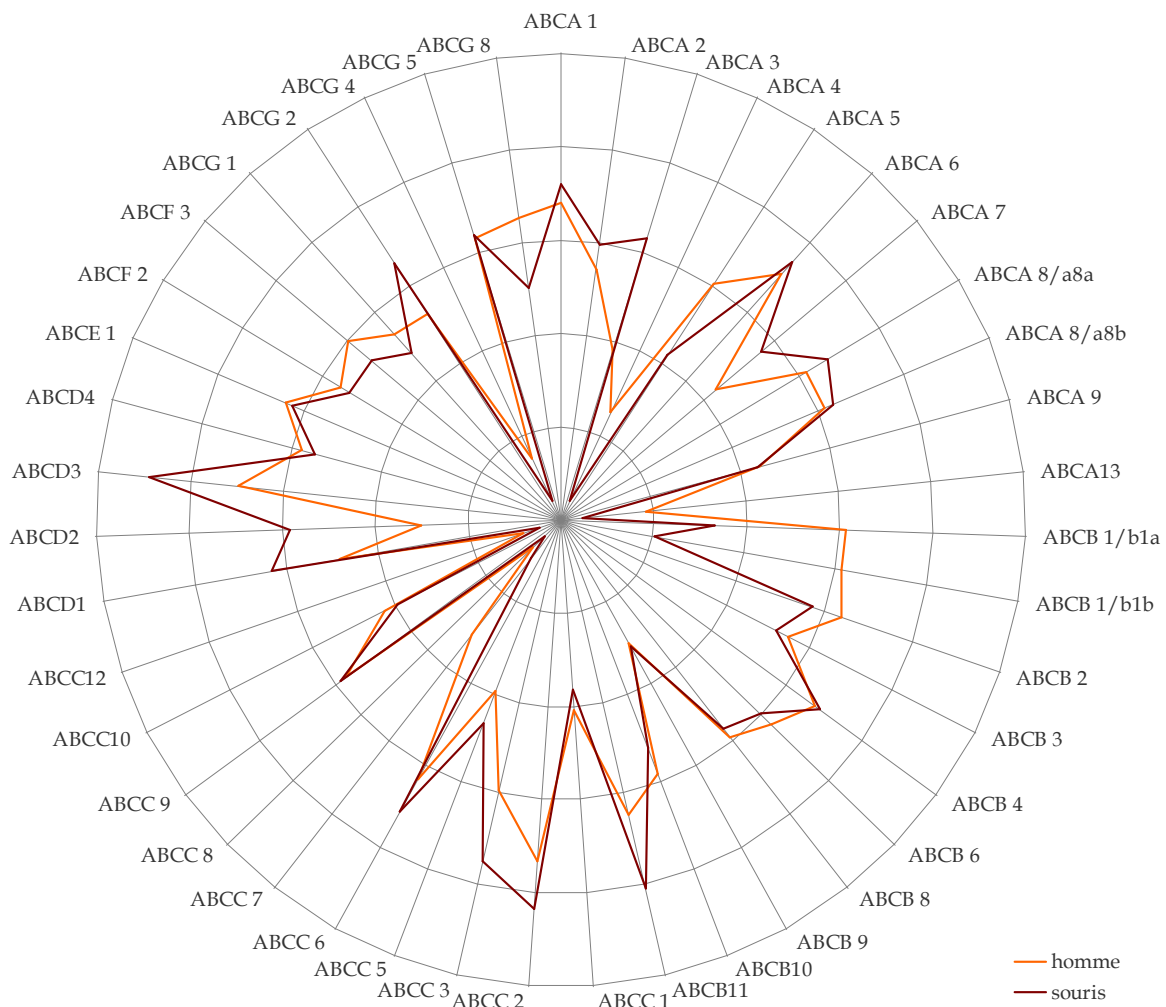


Figure 46 : Comparaison de l'expression des transporteurs ABC dans le foie humain et murin

IV BIBLIOGRAPHIE

- Beath, S. V. (2003). "Hepatic function and physiology in the newborn." Semin Neonatol **8**(5): 337-46.
- Berge, K. E., H. Tian, G. A. Graf, L. Yu, N. V. Grishin, J. Schultz, *et al.* (2000). "Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters." Science **290**(5497): 1771-5.
- Bisbal, C., C. Martinand, M. Silhol, B. Lebleu and T. Salehzada (1995). "Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway." J Biol Chem **270**(22): 13308-17.
- Cavelier, C., I. Lorenzi, L. Rohrer and A. von Eckardstein (2006). "Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1." Biochim Biophys Acta **1761**(7): 655-66.
- Chandra, P. and K. L. Brouwer (2004). "The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts." Pharm Res **21**(5): 719-35.
- Coughtrie, M. W., K. J. Bamforth, S. Sharp, A. L. Jones, E. B. Borthwick, E. V. Barker, *et al.* (1994). "Sulfation of endogenous compounds and xenobiotics--interactions and function in health and disease." Chem Biol Interact **92**(1-3): 247-56.
- Elferink, R. O. (2003). "Cholestasis." Gut **52 Suppl 2**: ii42-8.
- Evseenko, D., J. W. Paxton and J. A. Keelan (2006). "Active transport across the human placenta: impact on drug efficacy and toxicity." Expert Opin Drug Metab Toxicol **2**(1): 51-69.
- Faber, K. N., M. Muller and P. L. Jansen (2003). "Drug transport proteins in the liver." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 107-24.
- Frank, N. Y., A. Margaryan, Y. Huang, T. Schatton, A. M. Waaga-Gasser, M. Gasser, *et al.* (2005). "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." Cancer Res **65**(10): 4320-33.
- Green, T. P., R. F. O'Dea and B. L. Mirkin (1979). "Determinants of drug disposition and effect in the fetus." Annu Rev Pharmacol Toxicol **19**: 285-322.
- Imanaka, T., K. Aihara, T. Takano, A. Yamashita, R. Sato, Y. Suzuki, *et al.* (1999). "Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter." J Biol Chem **274**(17): 11968-76.
- Juchau, M. R., S. T. Chao and C. J. Omiecinski (1980). "Drug metabolism by the human fetus." Clin Pharmacokinet **5**(4): 320-39.
- Kaminski, W. E., A. Piehler and G. Schmitz (2000). "Genomic organization of the human cholesterol-responsive ABC transporter ABCA7: tandem linkage with the minor histocompatibility antigen HA-1 gene." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 782-9.
- Kaminski, W. E., J. J. Wenzel, A. Piehler, T. Langmann and G. Schmitz (2001). "ABCA6, a novel a subclass ABC transporter." Biochem Biophys Res Commun **285**(5): 1295-301.
- Krauer, B. and P. Dayer (1991). "Fetal drug metabolism and its possible clinical implications." Clin Pharmacokinet **21**(1): 70-80.
- Langmann, T., R. Maurer, A. Zahn, C. Moehle, M. Probst, W. Stremmel, *et al.* (2003). "Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues." Clin Chem **49**(2): 230-8.
- Marin, J. J., R. I. Macias, O. Briz, M. J. Perez and M. A. Serrano (2005). "Molecular bases of the excretion of fetal bile acids and pigments through the fetal liver-placenta-maternal liver pathway." Ann Hepatol **4**(2): 70-6.
- Miners, J. O. and P. I. Mackenzie (1991). "Drug glucuronidation in humans." Pharmacol Ther **51**(3): 347-69.
- Park, S., C. Shimizu, T. Shimoyama, M. Takeda, M. Ando, T. Kohno, *et al.* (2006). "Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat **99**(1): 9-17.
- Pelkonen, O. (1980). "Biotransformation of xenobiotics in the fetus." Pharmacol Ther **10**(2): 261-81.
- Raucy, J. L. and S. J. Carpenter (1993). "The expression of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 in fetal tissues." J Pharmacol Toxicol Methods **29**(3): 121-8.

- Ritter, C. A., G. Jedlitschky, H. Meyer zu Schwabedissen, M. Grube, K. Kock and H. K. Kroemer (2005). "Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5)." Drug Metab Rev **37**(1): 253-78.
- Rius, M., A. T. Nies, J. Hummel-Eisenbeiss, G. Jedlitschky and D. Keppler (2003). "Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane." Hepatology **38**(2): 374-84.
- Rurak, D. W., M. R. Wright and J. E. Axelson (1991). "Drug disposition and effects in the fetus." J Dev Physiol **15**(1): 33-44.
- Shirihai, O. S., T. Gregory, C. Yu, S. H. Orkin and M. J. Weiss (2000). "ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation." Embo J **19**(11): 2492-502.
- Small, D. M. (2003). "Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 4-6.
- Syme, M. R., J. W. Paxton and J. A. Keelan (2004). "Drug transfer and metabolism by the human placenta." Clin Pharmacokinet **43**(8): 487-514.
- Van Eyken, P., R. Sciot, F. Callea, K. Van der Steen, P. Moerman and V. J. Desmet (1988). "The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study." Hepatology **8**(6): 1586-95.
- Wanders, R. J., W. F. Visser, C. W. van Roermund, S. Kemp and H. R. Waterham (2007). "The peroxisomal ABC transporter family." Pflugers Arch **453**(5): 719-34.
- Yabuuchi, H., S. Takayanagi, K. Yoshinaga, N. Taniguchi, H. Aburatani and T. Ishikawa (2002). "ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver." Biochem Biophys Res Commun **299**(3): 410-7.
- Yasui, K., S. Mihara, C. Zhao, H. Okamoto, F. Saito-Ohara, A. Tomida, *et al.* (2004). "Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance." Cancer Res **64**(4): 1403-10.
- Yu, S. H., K. Nagayama, N. Enomoto, N. Izumi, F. Marumo and C. Sato (2000). "Intrahepatic mRNA expression of interferon-inducible antiviral genes in liver diseases: dsRNA-dependent protein kinase overexpression and RNase L inhibitor suppression in chronic hepatitis C." Hepatology **32**(5): 1089-95.

Chapitre V

Expression des transporteurs ABC dans des cellules souches humaines

Chapitre V : Expression des transporteurs ABC dans des cellules souches humaines

I INTRODUCTION

Parce qu'elles sont capables de se multiplier en principe « à l'infini » et qu'elles peuvent se transformer en différents types cellulaires, les cellules souches représentent une piste thérapeutique d'avenir pour étudier la fonction des gènes du développement et pourront peut-être ultérieurement être une possibilité d'application thérapeutique pour l'ensemble des maladies humaines.

On définit une cellule souche par deux propriétés essentielles :

La capacité d'autorenouvellement, c'est-à-dire la capacité à se multiplier à l'identique pour produire une population de cellules filles

La capacité, dans certaines conditions, de se différencier en un ou plusieurs type(s) cellulaire(s) spécialisé(s)

1 Les différents types de cellules souches

On distingue actuellement 4 types de cellules souches (Figure 47)

- Les cellules souches **totipotentes** sont les seules à pouvoir donner naissance à un organisme entier. Ces cellules constituent l'embryon dans les 4 premiers jours de son développement.
- Les cellules souches **pluripotentes** peuvent générer la plupart ou tous les tissus du corps adulte mais pas un organisme entier organisé.
- Les cellules souches **multipotentes** sont capables de produire plusieurs types de cellules dérivées d'un même feuillet embryonnaire. Elles sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique. Citons par exemple, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse qui sont à l'origine de toutes les cellules du sang ou les cellules mésenchymateuses qui donneront naissance aux futures cellules cartilagineuses, musculaires et adipeuses.

- Les cellules souches **unipotentes** sont à même de générer un seul type de cellules différenciées. On les appelle également progéniteurs intermédiaires ou précurseurs. On distingue les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes. Ces deux types de cellules souches aux potentialités radicalement différentes, comme cela sera expliqué plus loin, sont très prometteuses et permettent d'envisager une utilisation dans une perspective de médecine régénératrice. D'où l'intérêt majeur qu'elles suscitent dans la communauté scientifique.

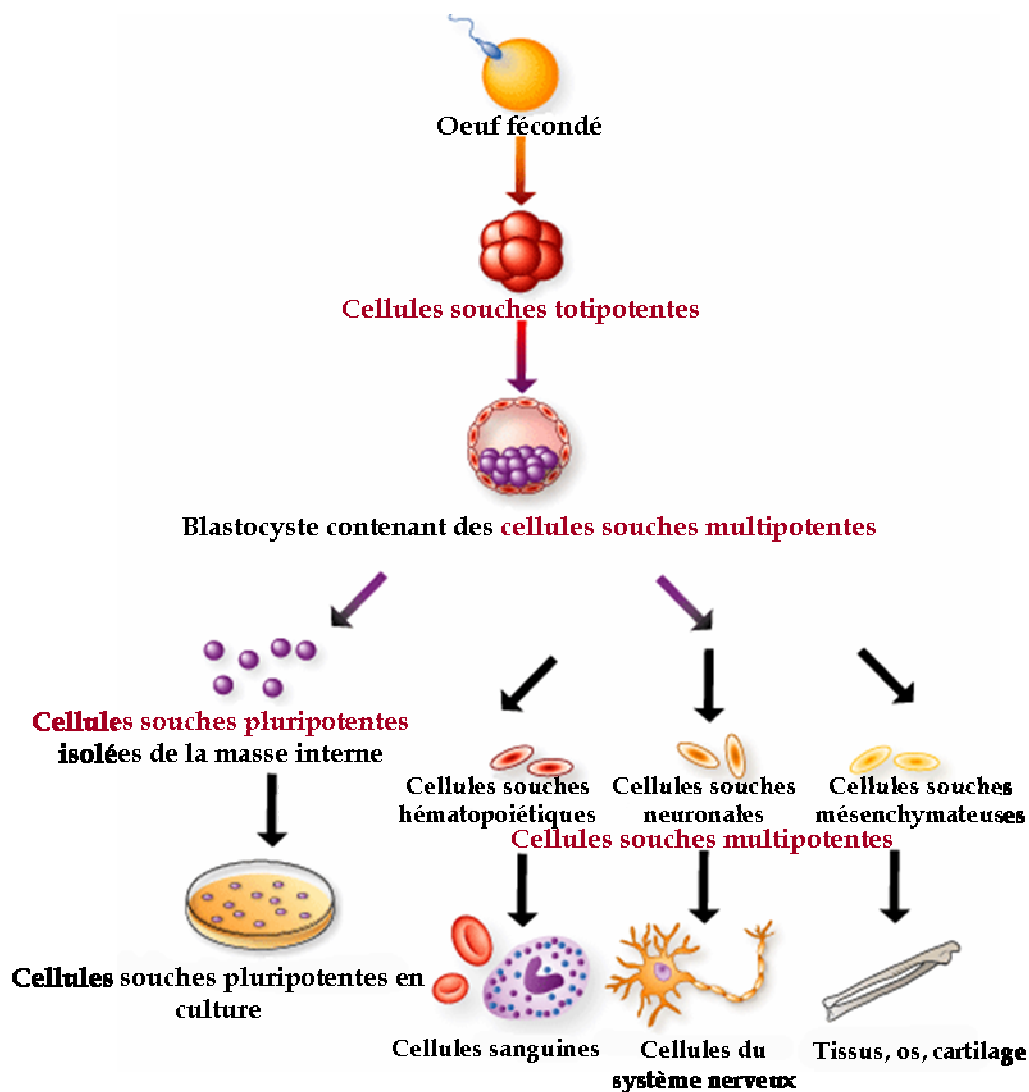


Figure 47 : Potentialités des cellules souches humaines

2 Cellules souches embryonnaires

2.1 Historique

L'histoire des cellules souches embryonnaires a débuté dans les années 70, avec l'étude de tumeurs associées aux gonades : les tératomes. Ces tumeurs renferment des tissus variés, souvent bien différenciés (musculaires, osseux, nerveux, etc.), mais organisés d'une manière anarchique, qui coexistent avec des cellules de type embryonnaire. Leroy Stevens montra que l'on peut obtenir des tératomes en greffant des blastocystes normaux, dans les testicules de souris.

C'est seulement en 1981 que Martin Evans et M.H. Kaufman (Evans and Kaufman 1981), ainsi que Gail Martin (Martin 1981), sont parvenus à isoler chez la souris des lignées stables à partir de la masse cellulaire interne d'un blastocyste, c'est-à-dire à partir des cellules d'embryons précoces de souris, cellules baptisées alors «cellules souches embryonnaires» ou ESC (Embryonal Stem Cell).

C'est en 1998, que des lignées de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ont été isolées par le laboratoire de J.A. Thomson (Thomson *et al.* 1998), à partir de blastocystes humains mis en culture.

2.2 Loi Française

La recherche sur l'embryon est, par principe, interdite en France. À titre dérogatoire et pour cinq ans, la loi de bioéthique du 6 août 2004 permet cependant la réalisation de recherches à finalité thérapeutique dans des conditions contrôlées. Les chercheurs autorisés peuvent travailler soit à partir d'embryons surnuméraires conçus dans le cadre d'une fécondation *in vitro*, que les parents choisissent de céder à la recherche, soit sur des lignées de cellules importées de pays étrangers et créées dans les mêmes conditions.

2.3 Obtention de cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires sont dérivées *in vitro* à partir de cellules présentes dans la masse interne de l'embryon au stade blastocyste (du cinquième au septième jour après la fécondation) (Figure 47). Lorsqu'elles sont mises en co-culture sur des fibroblastes embryonnaires murins ou humains, elles commencent à se diviser, on parle alors d'autorenouvellement indéfini. C'est à partir de cette population que sont obtenues ce qu'on appelle les lignées de cellules souches embryonnaires humaines ou hESC. Après l'autorenouvellement, la pluripotence est la deuxième propriété qui fait des hESC des cellules très convoitées en recherche biologique. Elles peuvent donner naissance aux trois feuilletts embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme qui sont à l'origine de tous les tissus de l'organisme et aux annexes extra-embryonnaires.

2.4 Différenciation de cellules souches embryonnaires

La différenciation des hESC peut être obtenue soit en les cultivant directement dans un milieu approprié, soit en passant par une étape intermédiaire où les hESC sont déposées en milieu semi-solide. Des agrégats sphéroïdes vont se former appelés « corps embryoides ». Des cavités vont apparaître dans certains corps embryoides. Cette transformation va de pair avec la modification de l'expression de gènes, due à l'apparition des différents feuilletts embryonnaires. La capacité de différenciation des hESC a été exploitée pour obtenir des progéniteurs de différents tissus. Ainsi, ont été obtenus des cardiomyocytes, des précurseurs neuronaux et des neurones fonctionnels, des kératinocytes, des cellules hématopoïétiques, des hépatocytes et des cellules d'îlots pancréatiques telles les cellules β produisant de l'insuline.

2.5 Des résultats encourageants chez l'animal....

Des résultats très prometteurs utilisant des cellules souches embryonnaires humaines ont déjà été obtenus chez l'animal. Grâce à ces cellules, deux équipes ont réussi à corriger des anomalies cardiaques chez le porc (Kehat *et al.* 2004) et la souris (Kofidis *et al.* 2004). D'autre part, une étude a montré que des cellules embryonnaires humaines pouvaient donner naissance *in vitro* à des neurones capables de produire de la dopamine, un précurseur manquant dans la maladie de Parkinson (Perrier and Studer 2003), (Perrier 2005).

Cependant, des obstacles techniques restent encore à franchir avant que les lignées de cellules souches embryonnaires ne puissent être utilisées cliniquement.

L'utilisation de ces cellules embryonnaires suscite des débats en matière de bioéthique, non seulement dans la phase recherche, mais aussi au moment de l'application clinique éventuelle.

3 Les cellules souches adultes

L'existence des cellules souches adultes a été mise en évidence dès les années 50. L'adulte a la capacité de produire de nouvelles cellules et surtout de régénérer des populations cellulaires constitutives de tissus comme la peau, le sang, le foie, l'intestin, la moelle osseuse....

La capacité d'autorenouvellement des cellules souches adultes, quelle qu'en soit l'origine n'a strictement rien de comparable avec celle des hESC. Les cellules souches adultes humaines ont un potentiel de division limité, surtout en ce qui concerne leur autorenouvellement : en effet, il est difficile d'obtenir une amplification à long terme des cellules souches adultes humaines sans qu'elles ne se différencient ou n'entrent en apoptose.

L'utilisation de cellules souches adultes peut être particulièrement intéressante en thérapie cellulaire. Elles ont fait l'objet de greffes autologues limitant ainsi les risques de rejet (Koc *et al.* 2000; Koc *et al.* 2002; Le Blanc *et al.* 2004).

4 Les cellules souches : de la recherche fondamentale à la recherche clinique

Les cellules souches représentent tout d'abord un outil précieux en recherche fondamentale. Elles permettent d'étudier le développement embryonnaire, de mieux comprendre les mécanismes liés aux cancers, etc. Les cellules souches embryonnaires peuvent également être utilisées comme modèles de maladies humaines au même titre que l'expérimentation animale. Puisqu'elles se multiplient « indéfiniment », elles sont une source très importante de tissus expérimentaux.

Néanmoins, c'est surtout pour leur potentiel thérapeutique que les cellules souches sont au cœur des recherches actuelles. En effet, quel que soit la nature de la cellule souche, c'est du tissu où elle se trouve que viennent les messages de différenciation. C'est cette propriété des cellules souches qui est à l'origine du concept de réparation d'un tissu, ou du maintien numérique d'une population cellulaire, chez un individu adulte. A partir de ce concept de régénération est apparu celui de thérapie cellulaire, par dépôt, au niveau de la lésion tissulaire, d'un contingent de cellules souches. L'objectif de la thérapie cellulaire serait de remplacer les cellules malades ou disparues par des cellules saines différenciées à partir de cellules souches. Il existe donc un grand espoir pour que ces cellules et leurs progéniteurs différenciés soient utilisés dans l'avenir lors de thérapies de remplacement (McKay 2000; McNeish 2004). Cependant, pour réaliser le potentiel de ces cellules, il est nécessaire d'accroître nos connaissances sur les processus qui régissent leur différenciation.

5 Les transporteurs ABC dans les cellules souches

En 1996, Goodell et ses collaborateurs ont décrit une nouvelle méthode pour isoler une population de cellules souches hématopoïétiques (HSC), basée sur la capacité des HSC à exporter un marqueur fluorescent. Un marquage des cellules avec le Hoechst 33342 a permis d'identifier une population de cellules non marquées, ayant exporté le colorant. Cette population a été appelée « Side Population » (SP) et désigne des cellules souches primitives (Figure 48). Les cellules souches peuvent donc exporter des marqueurs fluorescents vraisemblablement grâce à l'action d'un ou plusieurs transporteurs ABC.

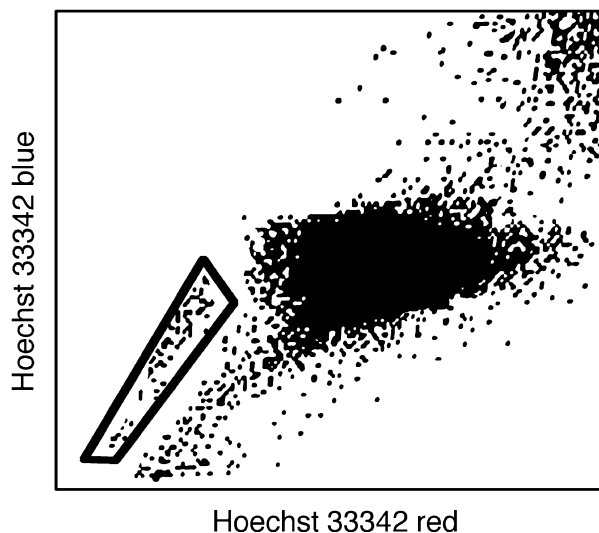


Figure 48 : Apparition de la « Side Population » (encadrée) suite à une coloration au Hoechst 33342

Comme l'activité de la P-glycoprotéine, cette activité d'export du Hoechst 33342 est sensible au vérapamil. Les auteurs attribuent alors cette activité à ABCB1 (Goodell *et al.* 1996). Cependant, plusieurs publications récentes montrent qu'ABCG2 est plus exprimé dans les cellules SP que dans les non SP, suggérant qu'ABCG2 pourrait également exporter le Hoechst 33342 et que le phénotype SP serait dû à l'expression de la protéine ABCG2 (Kim *et al.* 2002 ; Scharenberg *et al.* 2002 ; Guo *et al.* 2003). De plus, pour définir le rôle des transporteurs ABCB1 et ABCG2 dans les cellules souches hématopoïétiques, Zhou et ses collaborateurs ont utilisé des souris invalidées pour le gène *Abcg2*, ou pour *Abcb1a/b*. Les souris inactivées pour *Abcb1a* et *Abcb1b* ont un nombre normal de cellules SP dans la moelle osseuse, montrant que l'expression de *Abcb1a/b* n'est pas indispensable (Zhou *et al.* 2001). A l'inverse, des souris *Abcg2*^{-/-} ont un nombre de SP réduit dans la moelle osseuse et le muscle squelettique (Zhou *et al.* 2001 ; Zhou *et al.* 2002). Ceci laisse penser que la présence d'ABCG2 est requise pour obtenir ce phénotype SP.

Le phénotype SP n'est pas exclusif des cellules souches. Des cellules SP ont été identifiées pour certaines cellules cancéreuses ayant une résistance intrinsèque à des cytotoxiques. Le phénotype SP de ces cellules cancéreuses corrèle avec une forte expression de deux transporteurs ABC : ABCG2 et de façon surprenante ABCA3 (Hirschmann-Jax *et al.* 2004). La présence de transporteurs autres que ABCG2 ou ABCB1 pourrait donc être également essentielle dans les cellules de type SP.

Les cellules souches peuvent exporter des marqueurs fluorescents, comme le Hoechst 33342 et la Rhodamine 123, grâce à la présence d'un ou de plusieurs transporteurs ABC. Certains transporteurs ABC ont la capacité d'exporter des molécules cytotoxiques et pourraient donc jouer un rôle protecteur de survie à long terme pour ces populations progénitrices (Zhou *et al.* 2002 ; Lou and Dean 2007). Les mécanismes par lesquels ABCB1 conférerait une protection sont sûrement plus compliqués qu'un simple export de cytotoxiques. Des cellules qui surexpriment la P-glycoprotéine sont plus résistantes à une vaste gamme d'inducteurs de l'apoptose (irradiations UV, liaison du TNF- α , inhibition de l'activation de caspases, Fas ligand...) (Germann *et al.* 1996 ; Robinson *et al.* 1997; Bezombes *et al.* 1998; Matsushita *et al.* 1998; Smyth *et al.*

1998 ; Johnstone *et al.* 1999; Pallis and Russell 2000)). Il pourrait donc jouer un rôle anti-apoptotique.

Les transporteurs ABC pourraient également être impliqués dans l'autorenouvellement ou la différenciation des cellules souches. En effet, l'expression forcée d'Abcb1 ou Abcg2 avec des vecteurs rétroviraux a des effets directs sur les cellules souches murines. L'expression d'Abcg2 bloque le développement de l'hématopoïèse (Zhou *et al.* 2001) ; alors que la surexpression d'Abcb1 provoque l'expansion de cellules souches hématopoïétiques et une maladie myéloproliférative chez la souris (Bunting *et al.* 1998). Enfin, des études récentes suggèrent qu'ABCG2 pourrait réduire l'accumulation intracellulaire d'hème/porphyrine. L'expression de ce transporteur conférerait alors un avantage pour survivre dans des conditions d'hypoxie (Krishnamurthy *et al.* 2004).

L'expression de transporteurs ABC dans les cellules souches adultes a été essentiellement étudiée dans les cellules souches hématopoïétiques. Dans ces cellules la présence de deux transporteurs, ABCB1 et ABCG2, a été mise en évidence soit par transport de Hoechst, soit par PCR. Cependant, la présence d'autres transporteurs n'a pas été recherchée. S'agissant des cellules souches embryonnaires, très peu de travaux concernent les ABC transporteurs, toutefois, une équipe a publié récemment la présence d'Abcb1b et Abcg2 dans des blastocystes de souris (Sawicki *et al.* 2006).

Plusieurs membres de la famille des ABC peuvent transporter des cytotoxiques, le plus connu après ABCB1 étant ABCC1. On peut supposer que des transporteurs autres qu'ABCB1 et ABCG2 sont exprimés dans les cellules souches et qu'ils pourraient jouer un rôle de protection pour ces cellules. Ils seraient également capables de guider ces cellules vers un état de quiescence ou de différenciation. Le rôle de cette famille de transporteurs, dont les membres partagent de fortes homologies de topologies et de mécanismes fonctionnels semble donc primordial, dans différents types de cellules souches. Les transporteurs ABC émergent comme de nouveaux champs d'investigation dans la régulation de la biologie des cellules souches (Bunting 2002).

C'est dans cette optique que nous avons décidé d'étudier le profil d'expression de la famille des transporteurs ABC dans différents types de cellules souches. Pour cela, nous avons dessiné une carte microfluidique contenant les sondes de 44 transporteurs. Nous avons pu quantifier l'expression de ces transporteurs, par PCR quantitative en TaqMan, sur des cellules souches embryonnaires humaines et nous avons pu comparer ces résultats avec deux types de cellules souches embryonnaires ayant commencé à se différencier : des corps embryoïdes et des cellules de type mésenchymateuses dérivées de lignées de cellules embryonnaires. Nous avons également regardé le pattern d'expression dans des cellules souches adultes mésenchymateuses.

II RESULTATS

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Jacques Hatzfeld (Laboratoire de Biologie des cellules souches humaines – UPR 9045 Villejuif) qui nous a fourni des échantillons de cellules souches de lignées embryonnaires humaines.

Cette étude inclut 8 échantillons de cellules souches embryonnaires (hESC) ; 8 échantillons de corps embryoïdes (cellules souches embryonnaires en cours de différenciation : hEB) ; 2 échantillons de cellules souches de type mésenchymateuses dérivées de lignées de cellules embryonnaires (ES MSC) et de 6 échantillons de cellules souches mésenchymateuses adultes (hMSC).

1 Choix des gènes de référence

Les niveaux d'expression d'ARN messagers dans les cellules souches peuvent être mesurés par PCR quantitative. La précision de cette technique exige une bonne normalisation des données d'expression de gènes pour corriger les variations de quantité d'ADNc entre les échantillons. Les gènes couramment employés lors d'études de cellules souches en différenciation sont la GAPDH, la tubuline et l'actine (Yang *et al.* 2005; Cai *et al.* 2006). Cependant, il est bien connu que les expressions de plusieurs de ces gènes changent considérablement selon les tissus, et l'emploi d'un gène de référence pour la normalisation de données PCR reste à contrôler et à justifier. Il a d'ailleurs été montré que les niveaux d'expression de l'HPRT et de la tubuline varient considérablement lors de la différenciation de cellules souches embryonnaires murines (Murphy and Polak 2002). Enfin, une étude récente conseille trois gènes pour la normalisation de cellules souches humaines en différenciation : 18S, GAPDH et UBC, les trois gènes les moins stables étant l'actine, HPRT et B2M (Willems *et al.* 2006).

Dans notre étude, nous utilisons 4 populations de cellules souches différentes : 3 types de populations de cellules souches embryonnaires à plusieurs stades de différenciation et une population de cellules souches adultes mésenchymateuses. Pour la normalisation de nos données de PCR, nous voulions des gènes de référence qui ne varient pas au sein de chaque population, mais également des gènes stables toutes populations confondues.

Nous avons analysé l'expression de 16 gènes de référence couramment utilisés pour la normalisation. Nous avons utilisé le logiciel Normfinder pour mesurer leur stabilité d'expression. La Figure 49 nous montre les résultats obtenus pour l'étude de stabilité des 16 gènes de référence dans les 4 populations citées ci-dessus. En abscisse, les gènes sont classés du moins stable au plus stable sur les 4 populations confondues de cellules souches (diagramme rose). Les résultats individuels pour chaque population, sont également représentés.

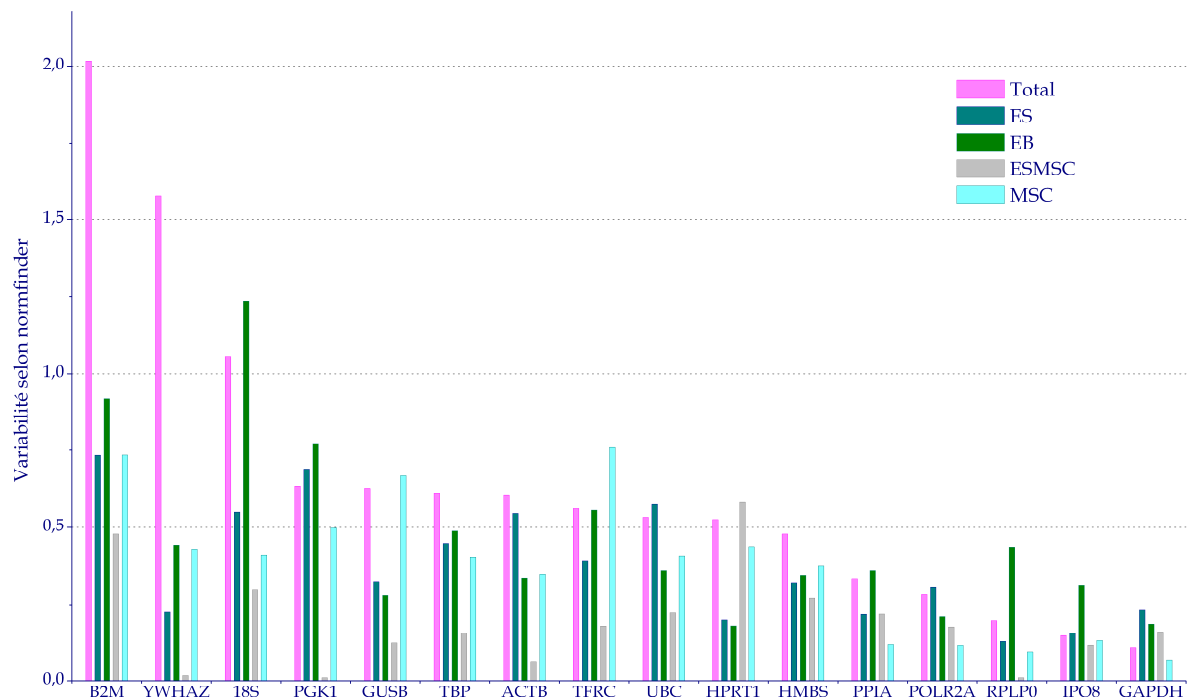


Figure 49 : Classement de 16 gènes de référence

L'analyse des 16 gènes de référence, sur l'ensemble des échantillons (en rose sur le graphique), nous montre que les cinq gènes les plus stables sont GAPDH, IPO8, RPLP0, POLR2A, et PPIA.

Toutefois si l'on mesure les variations intragroupes, RPLP0 semble plus variable dans la population de cellules EB. Nous avons donc décidé de l'éliminer pour la normalisation des données de PCR quantitative.

Nos résultats confirment que la GAPDH est un bon gène de référence pour la normalisation des cellules souches et que la B2M est un gène qui varie fortement dans ces échantillons. Contrairement aux données de la littérature, nous trouvons que le 18S n'est pas un bon candidat. Les données concernant l'actine, dans la littérature étant contradictoires, nous pensons comme signalé dans les travaux de Willems *et al.*, que ce gène n'est pas une bonne référence.

Nous avons conclu que l'UBC utilisée dans d'autres études n'était pas un des meilleurs gènes de référence.

Nous avons donc choisi de normaliser nos données par la moyenne géométrique des quatre meilleurs gènes de référence : GAPDH, IPO8, POLR2A, et PPIA.

2 Profils d'expression des transporteurs ABC

Nous avons utilisé une TLDA qui nous a permis de quantifier l'expression de 44 transporteurs ABC sur nos 4 populations de cellules souches. Nous n'avons pas étudié 5 transporteurs. Il s'agit d'ABCA12, ABCC8, ABCC12, ABCG5 et ABCG8.

Les résultats de PCR sont des moyennes de duplicata de PCR. Nous avons tracé deux classifications hiérarchiques pour représenter nos données de PCR.

La première classification (Figure 50) représente les niveaux d'expression de ces transporteurs ABC sur nos échantillons de cellules souches. Globalement si on compare les cellules souches à d'autres tissus, on constate alors leur richesse en ABC transporteurs.

Nous avons tracé cette classification à partir des valeurs de Ct normalisés de chaque échantillon. Cette représentation est centrée sur la valeur médiane de l'ensemble des Ct normalisés de cette expérience. La distance Euclidienne entre les ABC transporteurs permet de classer de façon hiérarchique les gènes testés. Le critère d'agrégation des distances utilisé pour la détermination des classes (clusters) est le lien maximum (Complete linkage). Nous avons utilisé le logiciel Genesis pour tracer cette représentation (Sturn 2001).

Suite à cette analyse, 6 groupes (ou clusters) apparaissent en fonction des profils d'expression des gènes. Le cluster noté 1 (12 gènes) et le cluster 2 (7 gènes) sont constitués de gènes très bien exprimés dans nos 4 populations de cellules. Les niveaux d'expression du cluster 2 sont toutefois un peu plus faibles. Le transporteur ABCC1, connu pour transporter des cytotoxiques, fait partie du cluster 1 et se trouve très bien exprimé dans l'ensemble de nos cellules souches.

Le cluster 6 (8 gènes) nous montre des gènes très faiblement exprimés. On peut noter qu'ABCB1 se trouve dans ce cluster et qu'il est donc faiblement représenté dans les cellules souches embryonnaires et adultes.

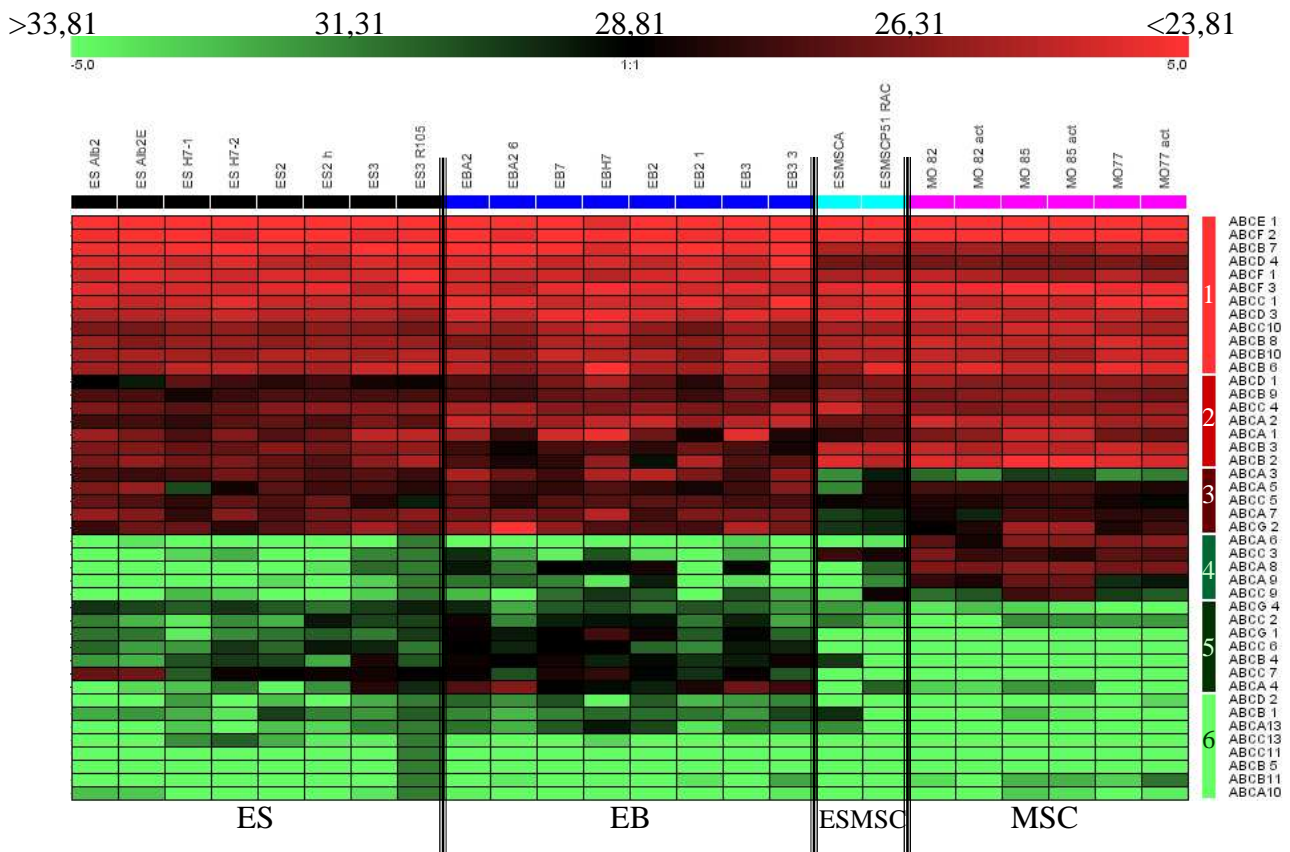


Figure 50 : Profil d'expression des transporteurs ABC dans des échantillons de cellules souches

Les clusters 3 (5 gènes), 4 (5 gènes) et 5 (7 gènes) sont les clusters au sein desquels il y a le plus de variabilité entre nos 4 populations. Le cluster 3 a regroupé des gènes pour lesquels il y a une forte variation d'expression entre la population EB et les cellules souches mésenchymateuses d'origine embryonnaire. Dans ce groupe de gènes, seul ABCA3 voit son expression éteinte également dans les cellules souches mésenchymateuses adultes. Parmi ce groupe de gènes se trouve ABCG2 considéré comme faisant partie des ABC caractéristiques du phénotype SP. Le cluster 4 comprend 5 gènes qui sont exprimés dans les cellules souches adultes mésenchymateuses et absents de nos 3 populations de cellules souches embryonnaires. Ce cluster comprend 3 ABC de la sous-famille A et 2 gènes de la sous-famille C. Le cluster 5 a regroupé 7 gènes relativement peu représentés dans les cellules souches mais néanmoins plus exprimés dans les cellules EB.

Pour étudier nos données, nous avons tracé un autre type de classification hiérarchique. Cette fois-ci, nous avons centré nos valeurs de Ct normalisés par rapport à la valeur médiane des Ct normalisés obtenus pour chaque transporteur. Ceci nous permet d'observer non plus les niveaux d'expression, mais de mesurer plus précisément les variations d'expression de nos transporteurs (Figure 51).

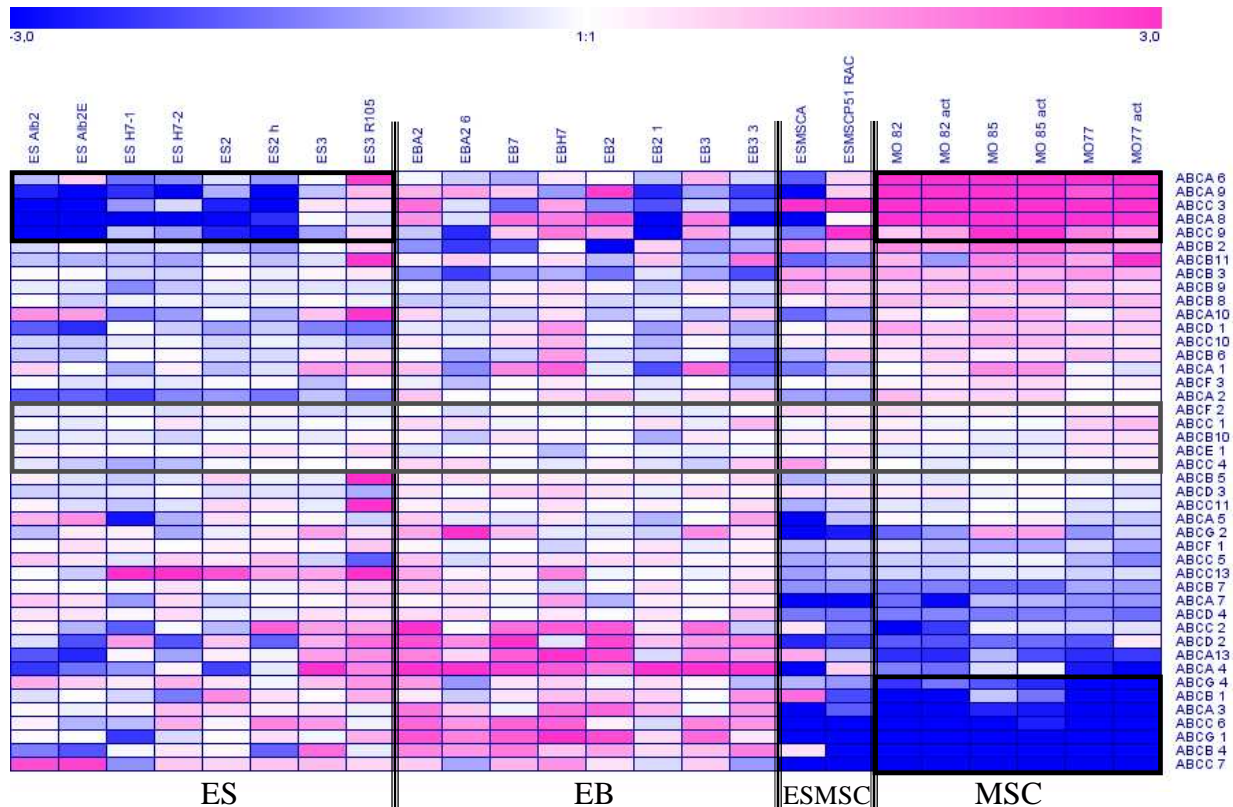


Figure 51 : Variations d'expression des transporteurs ABC Les bornes de variations de Ct sont fixées à ± 3 Ct du Ct médian de chaque transporteur.

A titre d'exemple, des groupes de transporteurs variant beaucoup ont été encadrés en noir. Un groupe de 5 transporteurs (ABCA6, ABCA8, ABCA9, ABCC3 et ABCC9) semble particulièrement intéressant : ce groupe de gènes est beaucoup plus exprimé dans les cellules souches adultes que dans les cellules souches d'origine embryonnaire. Un autre groupe de gènes présente une plus faible expression cette fois-ci dans les cellules souches mésenchymateuses adultes. Il s'agit des 7 gènes : ABCA3, ABCB1, ABCB4, ABCC6, ABCC7, ABCG1 et ABCG4.

Au centre du cluster, 5 transporteurs ABC sont encadrés en gris : ABCB10, ABCC1, ABCC4, ABCE1 et ABCF2. Ces transporteurs ne varient ni à l'intérieur de nos populations ni entre nos populations. Leur expression est donc particulièrement stable.

Afin de comparer les différentes populations de cellules souches, nous avons également confronté les valeurs médianes des Ct normalisés de ces populations entre elles (Figure 52). Chaque cercle concentrique est séparé du suivant par 3,33 Ct soit un facteur 10 de variation d'expression.

Cette représentation met en avant les fortes variations que nous avons pu observer sur nos clusters comme par exemple l'expression spécifique d'ABCA6 dans les cellules MSC. Elle permet également de voir les gènes dont l'expression ne varie pas entre nos populations, comme nous l'avions vu pour ABCC1 et ABCE1 qui apparaissent sur ce graphique comme deux des transporteurs les plus exprimés. Mais aussi de distinguer ceux qui sont toujours absents dans les cellules souches : ABCA10, ABCB5 et ABCC11.

D'autres transporteurs comme ABCA4 sont spécifiquement exprimés dans les cellules EB. ABCA8 est présent seulement dans les MSC et les EB, avec une expression nettement plus élevée dans les MSC.

Ce graphique nous permet de remarquer les gènes dont l'expression varie faiblement, mais progressivement au cours de la différenciation. C'est le cas notamment d'ABCG4, dont l'expression s'éteint progressivement au cours des différents stades de différenciation.

Il est aussi très intéressant de noter que, pour certains transporteurs ABC, il y a une très grande différence entre les cellules souches embryonnaires pas ou peu différenciées et les cellules engagées dans un même programme cellulaire (mésenchyme), c'est-à-dire entre les deux types de populations ES/EB et ESMSC/MSC. ABCC7, ABCG1 et ABCC6 sont exprimés dans les deux populations les plus primitives, alors qu'ABCC3, et dans une moindre mesure ABCB2 et ABCB3 sont plus présents dans les populations de cellules mésenchymateuses.

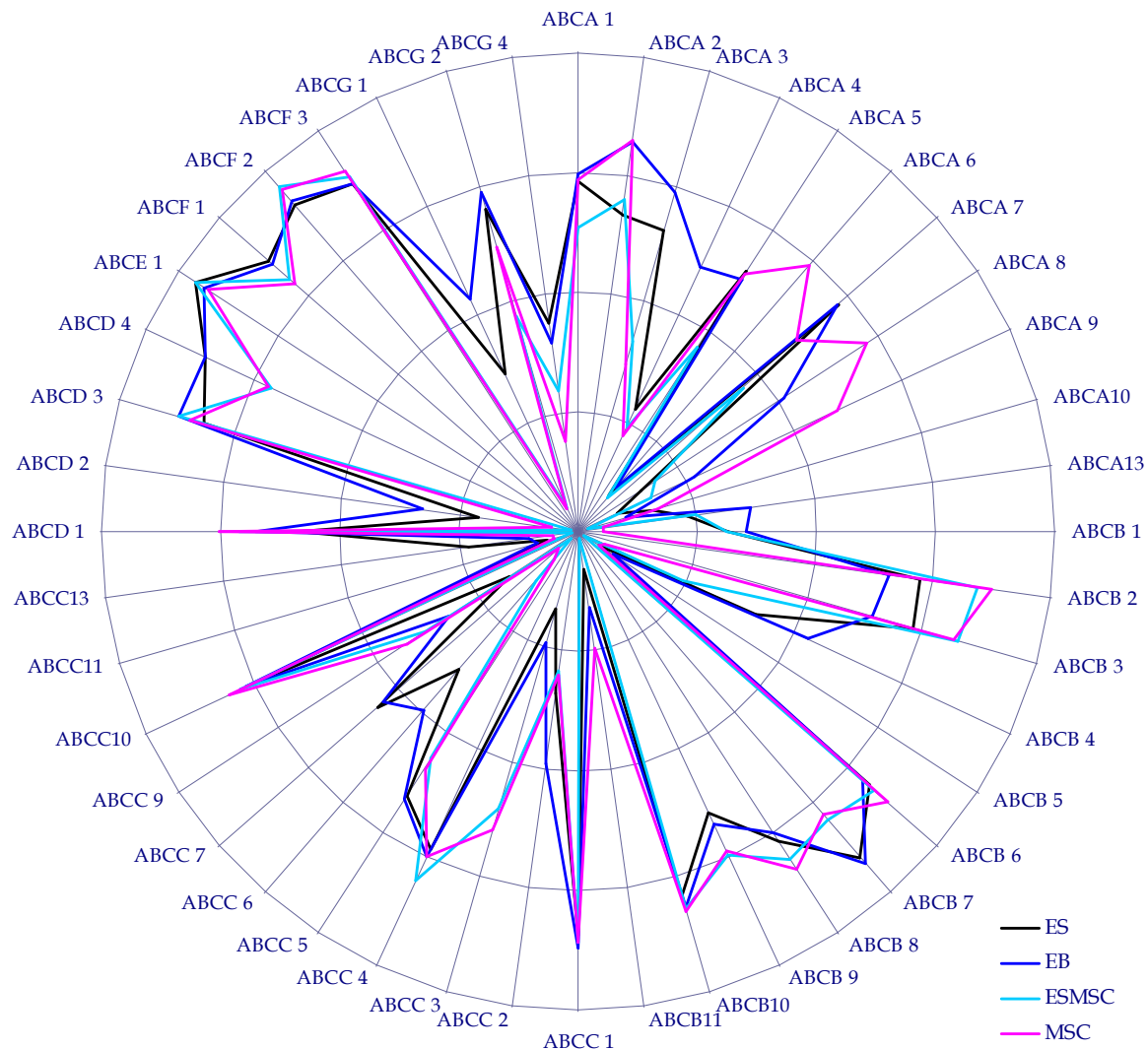


Figure 52 : Profil d'expression des transporteurs ABC dans 4 populations de cellules souches d'origine embryonnaire et adultes.

3 Quantification relative

Dans le paragraphe précédent, nous avons visualisé les niveaux d'expression ainsi que les variations d'expression de l'ensemble des transporteurs ABC de nos 4 populations. Nous voulons maintenant illustrer et calculer les valeurs de quantification relative entre populations, indépendamment pour chaque transporteur ABC. Nous avons choisi une représentation qui, en tenant compte des niveaux d'expression, nous permet de visualiser l'homogénéité (ou l'hétérogénéité) au sein d'une population. Pour chaque ABC transporteur, nous avons donc représenté les 4 populations de cellules souches sous forme de diagramme de Tuckey (voir Annexe en fin de chapitre). Nous avons également représenté les valeurs obtenues pour les ES-MSc ; toutefois cette population ne comprenant que deux échantillons, nous n'avons pas utilisé ces données pour les calculs suivants.

Le Tableau 10, montre une sélection de transporteurs ABC que nous voyons varier entre nos populations. Dans ce tableau, nous avons noté les transporteurs ABC ayant au minimum un Ct médian de 31 dans une de ses populations. Nous nous sommes intéressés à des transporteurs pour lesquels on observe une variation d'expression d'au moins un facteur 2.

Tendances observées	Niveaux d'expression	ABC	RQ	p
Variation lors de la différenciation	MSC > ES	ABCA2	4,09	< 10 ⁻³
		ABCA8	145,94	< 10 ⁻³
		ABCC9	18,33	< 10 ⁻³
		ABCC10	2,09	< 10 ⁻³
		ABCD1	4,41	< 10 ⁻³
	ES > MSC	ABCB1	7,23	0,0013
	ABCC13	5,07	0,0190	
	ABCG4	10,93	< 10 ⁻³	
Variation lorsque engagé dans un programme tissulaire	ESMSC-MSc>ES-EB	ABCB2	4,17	< 10 ⁻³
		ABCB3	2,42	< 10 ⁻³
		ABCB8	2,01	< 10 ⁻³
		ABCB9	2,51	< 10 ⁻³
		ABCC3	72,06	< 10 ⁻³
	ES-EB > ESMSc-MSc	ABCA3	14,04	< 10 ⁻³
		ABCA7	2,93	0,0026
		ABCB7	3,16	< 10 ⁻³
		ABCC6	17,56	< 10 ⁻³
		ABCC7	118,33	< 10 ⁻³
	ABCD4	3,40	< 10 ⁻³	
	ABCG1	15,64	< 10 ⁻³	
Tissus Spécifiques	EB	ABCA4	14,69	0,0018
	MSc	ABCA6	203,27	< 10 ⁻³
		ABCA9	67,75	< 10 ⁻³

Tableau 10 : Transporteurs ABC variant dans nos échantillons de cellules souches

Les ratios de quantification (RQ) sont calculés à partir des valeurs médianes des Ct normalisés des populations. Les valeurs de p calculées sur les Ct normalisés ont été obtenues en appliquant le test de Mann & Whitney. Toutes ces valeurs sont calculées entre la population ES et la population MSC adulte. Pour le transporteur ABCA4 qui est spécifique des cellules EB, les valeurs de RQ et de p sont calculées entre les cellules ES et les cellules EB. Le RQ donne une indication du facteur de variation d'expression entre deux échantillons. Le p est la probabilité qui indique si la différence de ces niveaux d'expression est significative.

Notre analyse statistique montre que pour ces transporteurs ABC, nos populations sont significativement différentes au seuil 5%. Les ratios mesurés peuvent être parfois très importants (200 fois). On peut distinguer 3 tendances de variations d'expression :

- des variations au cours de la différenciation des cellules souches. Les variations les plus fortes concernent ABCA8, ABCC9 et ABCG4.

- des variations lorsque la cellule s'engage vers un programme tissulaire précis (le mésenchyme). Les variations les plus importantes étant pour les transporteurs ABCC3 et ABCC7, ABCA3, ABCC6, ABCG1.

- les transporteurs préférentiellement exprimés dans un seul type de cellules souches : ABCA4 qui est plus exprimé dans les cellules EB ; ABCA6 et ABCA9 spécifiques des MSC.

IV DISCUSSION

Nos résultats montrent que les ABC sont relativement bien exprimés dans les cellules souches, aux différents stades de différenciation, et que l'expression de certains transporteurs varie entre nos différentes populations. Parmi ces ABC, certains transportent des lipides, des cytotoxiques, des ions ou ont une fonction encore inconnue. Ces acteurs de fonctions cellulaires variées pourraient participer de façon essentielle à l'activation, l'auto-renouvellement, la différenciation et la protection des cellules souches humaines.

En observant ces variations entre nos populations de cellules souches, on peut remarquer que les cellules les plus différenciées, ou celles qui sont engagées dans un programme tissulaire défini, expriment globalement moins de transporteurs ABC. D'autre part, certains transporteurs semblent plus spécifiques d'un état de différenciation. Ces différences d'expression de transporteurs ABC peuvent traduire une modification du transport de molécules toxiques ou de substrats inconnus qui pourraient participer à l'engagement de la cellule vers la différenciation.

L'essentiel des travaux sur les transporteurs ABC effectués dans les cellules souches ont concerné ABCB1 et ABCG2 en raison du phénotype d'efflux de colorant Hoechst 33342 (phénotype SP) qui avait été constaté dans ces cellules (Goodell *et al.* 1996). Ce phénotype SP a été initialement attribué à ABCB1, mais récemment plusieurs travaux

ont impliqué ABCG2 dans ce phénotype (Kim *et al.* 2002 ; Scharenberg *et al.* 2002 ; Guo *et al.* 2003). Dans la littérature, ces deux transporteurs ont également été détectés dans des cellules souches primitives de tissus tels que, la moelle osseuse, la glande mammaire chez la souris et le cœur humain (Kim *et al.* 2002 ; Jonker *et al.* 2005 ; Chiba *et al.* 2006 ; Meissner *et al.* 2006).

Dans notre étude, l'expression d'ABCB1 est faible et diminue (de plus de 7 fois) au cours de la différenciation. En revanche ABCG2 est bien exprimé dans nos 4 populations de cellules souches. Les cellules souches qui doivent en principe s'auto-renouveler à l'infini ont vraisemblablement besoin de systèmes efficaces de détoxification auxquels pourrait participer ABCG2 (Abbott 2006). Cependant, d'autres rôles ont été proposés pour ABCG2 dans les cellules souches. Un groupe de recherche a montré que l'expression forcée d'ABCG2 empêche le développement hématopoïétique, et a pour conséquence de diminuer la quantité de progéniteurs dans la moelle et le sang périphérique (Ueda *et al.* 2005). Par conséquent, les auteurs suggèrent que l'expression d'ABCG2 pourrait jouer un rôle dans l'auto-renouvellement des cellules souches primitives en bloquant partiellement la différenciation. ABCG2 pourrait par exemple expulser un substrat capable d'induire la différenciation. D'autre part, la surexpression d'ABCB1 dans des cellules de la moelle induirait la prolifération des cellules SP (Bunting *et al.* 2000). Par conséquent l'expression d'ABCB1 pourrait caractériser des cellules souches en prolifération, alors que l'expression d'ABCG2 pourrait distinguer des cellules plus quiescentes.

Le phénotype SP pourrait cependant être dû à l'expression d'autres transporteurs. Certains transporteurs que nous avons vu varier au cours de la différenciation ABCA3, ABCB1, ABCB2, ABCC7 et ABCG1 ont d'ailleurs été décrits dans des travaux sur les cellules SP. En effet, dans des progéniteurs leucémiques de phénotype SP, le transporteur ABCA3 a été détecté (Hirschmann-Jax *et al.* 2004; Norwood *et al.* 2004). Dans nos expériences, nous avons vu que ce transporteur ABCA3 était surexprimé dans les cellules ES et EB comparées aux cellules ayant commencé un programme de différenciation cellulaire (ES-MSK et MSK). Une autre équipe a testé l'expression de plusieurs transporteurs ABC sur des cellules de phénotype SP isolées à partir d'hépatocarcinome. Leur conclusion est que ce phénotype ne semble pas être dû uniquement à ABCG2, mais plutôt à plusieurs transporteurs, parmi lesquels ABCB1, ABCB2, ABCC7 et ABCG1 (Chiba *et al.* 2006). Ces publications, qui ont suggéré une implication de plusieurs transporteurs ABC dans des cellules souches tissulaires de phénotype SP présentent des similarités avec nos résultats obtenus sur différents types de cellules souches humaines embryonnaires et adultes.

L'analyse de nos 4 populations de cellules souches nous montre que l'expression de plusieurs transporteurs de lipides diminue fortement au cours de la différenciation ou entre les cellules ES et les cellules MSK adultes : c'est le cas notamment d'ABCA3, ABCA7, ABCG1 et ABCG4. Ces ABC sont responsables de l'efflux de lipides ou de cholestérol (Mulugeta *et al.* 2002; Abe-Dohmae *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Linsel-Nitschke *et al.* 2005; Vaughan and Oram 2006; Ban *et al.* 2007). Le cholestérol est l'un

des composants lipidiques principaux de la membrane plasmique de cellules de mammifères. Ce composé a un impact important sur les propriétés physiques de la bicouche membranaire, telles que la composition en phospholipides, la fluidité de membrane, la déformation et l'élasticité de la membrane (Kwik *et al.* 2003; Silviu 2003; Barenholz 2004). Une publication récente montre que des cellules souches traitées par simvastatine perdent leur capacité d'auto-renouvellement (Lee *et al.* 2007). On sait que lors de traitement par des statines, l'expression de transporteurs de cholestérol tels qu'ABCG1 diminue (Wong *et al.* 2007). Ces deux publications laissent penser que la diminution de l'expression de transporteurs de lipides induit une perte de la capacité d'auto-renouvellement. Ces deux publications sont en accord avec nos observations qui montrent que l'expression de certains transporteurs de cholestérol diminue avec la perte de pluripotentialité.

On peut donc se demander si la composition lipidique de la membrane joue un rôle essentiel sur la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches. De plus, on sait que cette composition en lipides peut influencer également l'activité de transporteurs ABC comme ABCB1. D'autre part, certains transporteurs capables de transporter des lipides peuvent également transporter des xénobiotiques (van Helvoort *et al.* 1996 ; Janvilisri *et al.* 2003 ; Boonstra *et al.* 2004). Les transporteurs de lipides que nous voyons varier dans nos différentes cellules souches pourraient donc assurer une fonction de détoxication.

Un second groupe de transporteurs ABC varie, il s'agit d'ABCA2, ABCB1, ABCC3, ABCC6 et ABCC10. Ces transporteurs sont impliqués dans le transport de cytotoxiques (Chen *et al.* 1986 ; Gros *et al.* 1986 ; Kool *et al.* 1999 ; Belinsky *et al.* 2002; Boonstra *et al.* 2004; Hopper-Borge *et al.* 2004). L'expression d'ABCB1 et ABCC6 diminue entre les cellules ES et les cellules MSC. Leur présence dans les cellules ES reste néanmoins très faible mais leur expression s'éteint dans les cellules souches adultes. Au contraire, ABCA2, ABCC3 et ABCC10 voient leur expression augmenter dans les cellules souches les plus différenciées. On peut souligner les profils d'expression d'ABCC3 dont les variations d'expression sont de 72 fois. Ce transporteur a été décrit principalement dans le rein, le foie et l'intestin (Scheffer *et al.* 2002) et serait impliqué dans le transport de substrats dans les hépatocytes. ABCC3 peut également transporter des cytotoxiques incluant des agents de chimiothérapie. Nous montrons qu'ABCC3 est fortement exprimé dans les cellules souches adultes, on peut penser que ce transporteur pourrait contribuer à la protection de la cellule souche contre l'exposition fréquente à différents xénobiotiques.

Un autre membre de la sous-famille C, ABCC9 varie dans nos populations de cellules souches. Cet ABC est avec ABCC8 l'un des deux récepteurs à sulfonylurées (Inagaki *et al.* 1996). Cette protéine fait partie d'un complexe macromoléculaire qui forme avec les sous-unités Kir un canal potassium ATP dépendant (Clement *et al.* 1997). Les canaux KATP jouent un rôle fonctionnel important dans de nombreux tissus incluant la cellule β pancréatique, le neurone, le muscle cardiaque, le muscle squelettique et le muscle lisse. Récemment, deux mutations d'ABCC9 ont été associées à des

cardiomyopathies dilatées (Bienengraeber *et al.* 2004). Dans notre étude, le transporteur ABCC9 augmente progressivement au cours de la différenciation pour atteindre une variation, entre les cellules ES et les MSC adultes, de 18 fois environ. Une publication montre que l'expression de canaux potassium, dont Kir, est essentielle pour la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques (Shirihai *et al.* 1998). Cette publication, qui montre l'importance de canaux potassium dans la différenciation de progéniteurs, corrèle avec nos observations sur les cellules souches. En effet, l'expression d'ABCC9 augmente dans les cellules souches MSC, qui sont engagées dans un programme tissulaire, en comparaison des cellules souches embryonnaire ES. On peut penser que l'augmentation de ce transporteur va de pair avec une augmentation de Kir, pour former un canal KATP fonctionnel qui serait essentiel à la différenciation des cellules souches.

Les 5 variations les plus importantes que nous avons quantifiées concernent 3 transporteurs de la sous-famille A (ABCA6, ABCA8 et ABCA9) et deux transporteurs de la sous-famille C (ABCC3 et ABCC7).

Les 3 transporteurs de la sous-famille A sont spécifiquement exprimés dans les cellules MSC adultes. Ces trois transporteurs sont très peu étudiés et leur fonction biologique et leurs substrats sont inconnus. Néanmoins ces transporteurs appartiennent tous à une sous-famille de gènes dont l'expression semble être dépendante de la concentration en cholestérol intracellulaire (Piehler *et al.* 2002). Ces trois gènes très peu étudiés dans la littérature augmentent considérablement (jusqu'à 200 fois) dans les cellules souches adultes. Une caractérisation de la fonction de ces protéines permettrait de mieux comprendre le rôle que ces transporteurs peuvent avoir dans ce type cellulaire.

Les deux transporteurs de la sous-famille C dont les variations sont les plus fortes sont ABCC3 et ABCC7. Nous avons vu qu'ABCC3 avait potentiellement un rôle dans la protection contre les cytotoxiques dans les cellules engagées dans un programme de différenciation tissulaire. ABCC7 présente au contraire un profil inversé avec une expression très majoritaire dans les cellules souches embryonnaires. ABCC7 est le gène dont la mutation est responsable de la mucoviscidose (Riordan *et al.* 1989). Sa fonction de canal chlore a été très largement décrite. Cependant, un rôle direct dans le transport de glutathion a également été démontré (Kogan *et al.* 2003). La mesure de ces activités de transport avec les cellules souches embryonnaires, permettrait peut-être de comprendre la fonction de cette protéine que nous voyons très exprimée dans ce type cellulaire.

Il est très difficile de conclure sur le rôle que pourraient jouer les transporteurs ABC dans ces différentes cellules souches. Néanmoins, on peut remarquer que de nombreux transporteurs connus pour réguler différentes fonctions cellulaires (détoxification, transport de cholestérol/lipide) varient selon le type étudié. Ces transporteurs ABC pourraient via différents mécanismes cellulaires (stimulation par potentiel de membrane, variation de la composition lipidique de la membrane, efflux

de substrats) orienter ces cellules souches soit vers l'auto-renouvellement soit la différenciation. Jusqu'à présent, le transporteur ABCG2 sert de marqueur de cellules SP. Nous avons montré que d'autres transporteurs ABC pourraient être utilisés pour spécifier un état de différenciation dans les cellules souches.

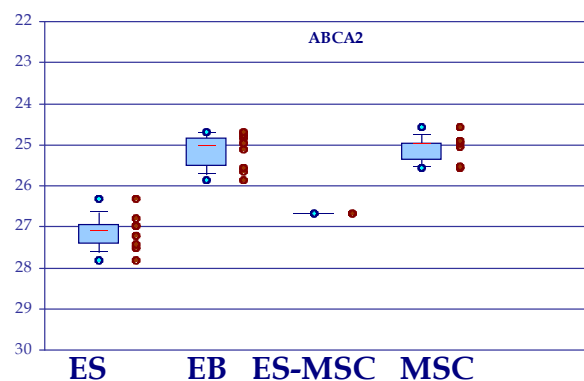
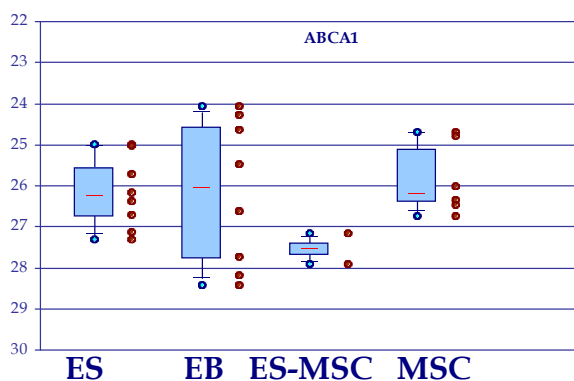
La connaissance du profil d'expression en ABC transporteurs devrait permettre de compléter la cartographie détaillée de l'expression progressive des gènes exprimés dans les cellules souches. Ces gènes sont vraisemblablement impliqués dans la formation des différents types cellulaires, dans leur survie, dans leur multiplication.

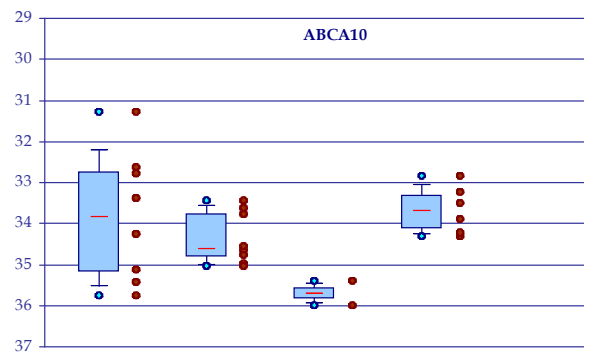
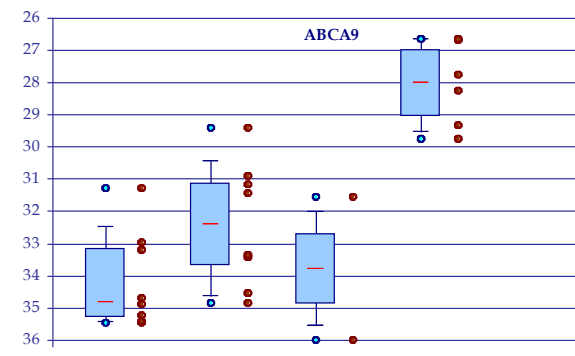
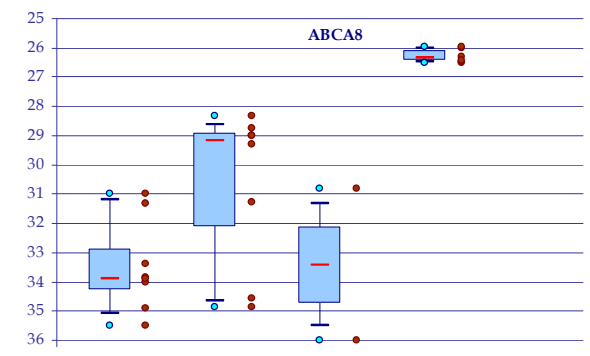
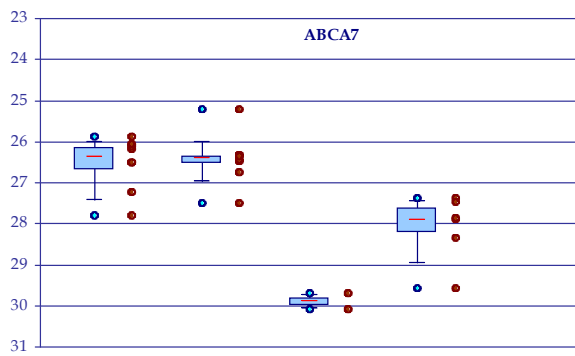
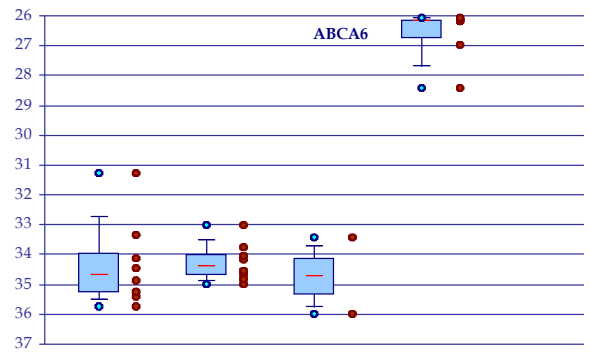
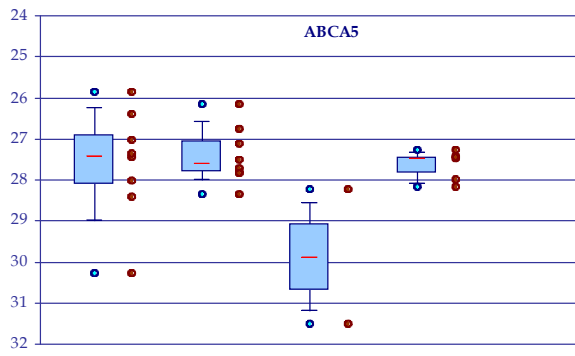
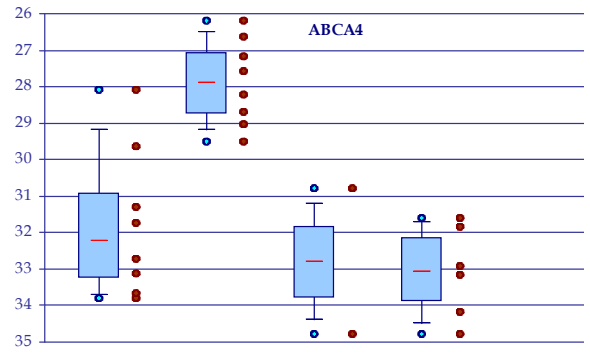
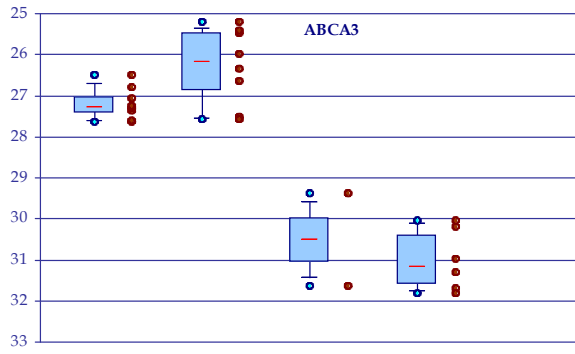
Ces cellules souches expriment plusieurs ABC connus pour être impliqués dans des pathologies humaines et pourraient représenter d'excellents modèles d'étude de ces pathologies.

V ANNEXE

Ces représentations sont tracées à partir des valeurs de Ct normalisés. Pour le diagramme de Tuckey, la ligne rouge représente la valeur médiane, les bornes de la boîte représentent les 1^{ers} et 3^{èmes} quartiles, les "moustaches" sont obtenues en calculant les 1^{ers} et 9^{ème} déciles, enfin les cercles bleus représentent les valeurs maximale et minimale. Dans ce genre de représentation, 80% de la répartition de la population se trouvent entre les 1^{er} et 9^{ème} déciles. A droite de chaque diagramme, est représentée la répartition des points de chaque population.

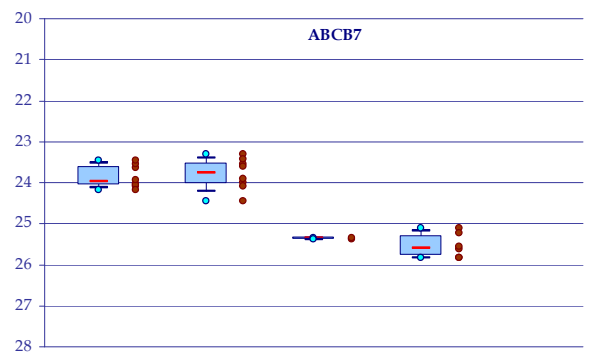
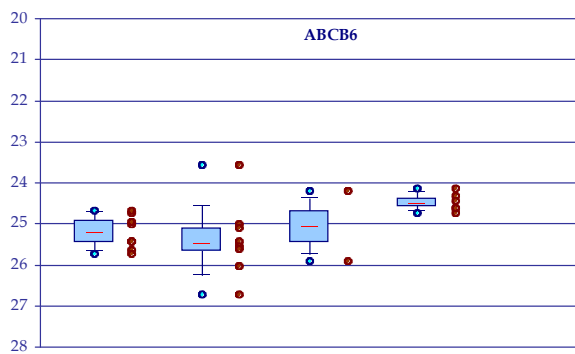
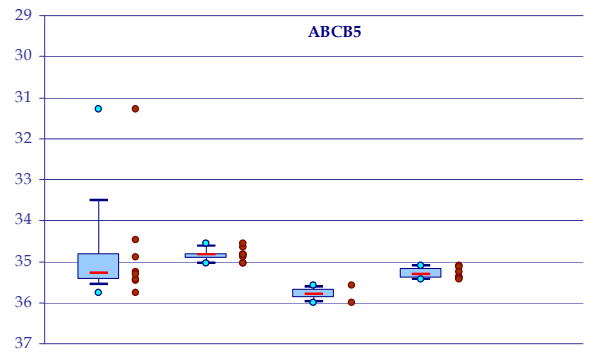
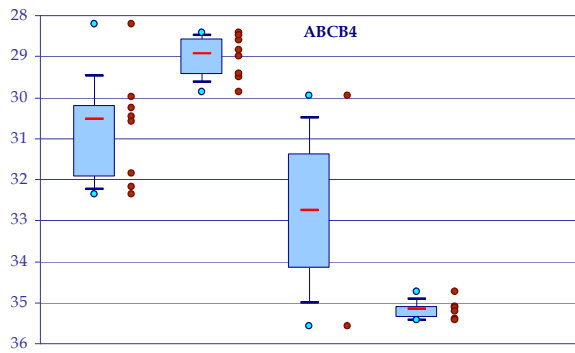
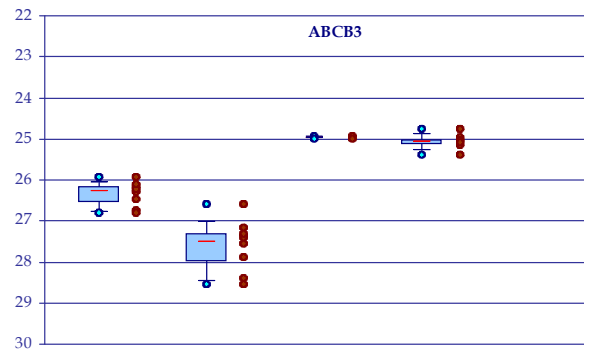
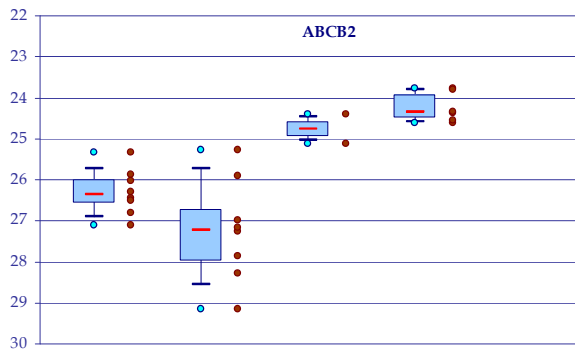
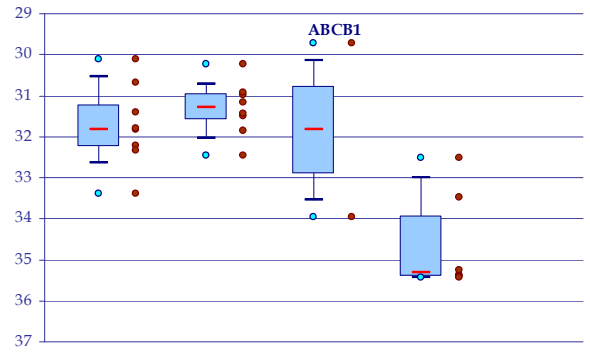
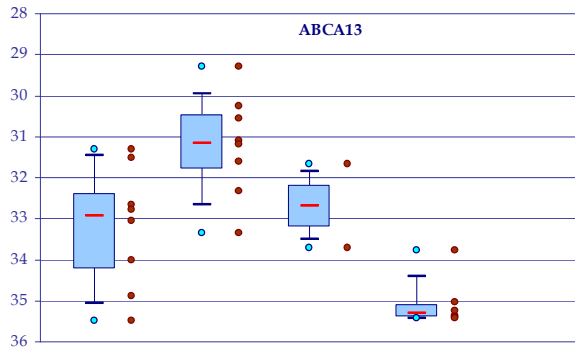
Sont représentés de gauche à droite ES, EB, ES-MSc et MSc.





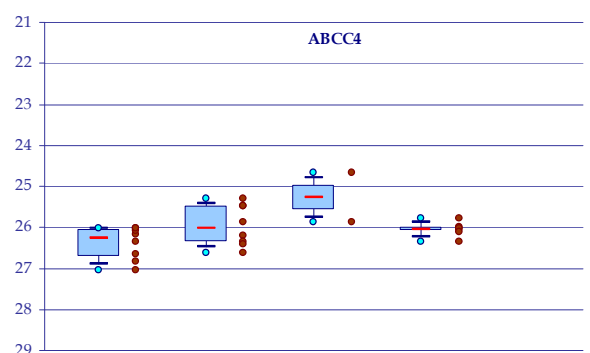
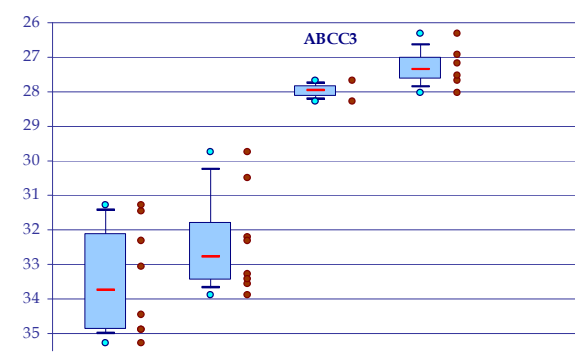
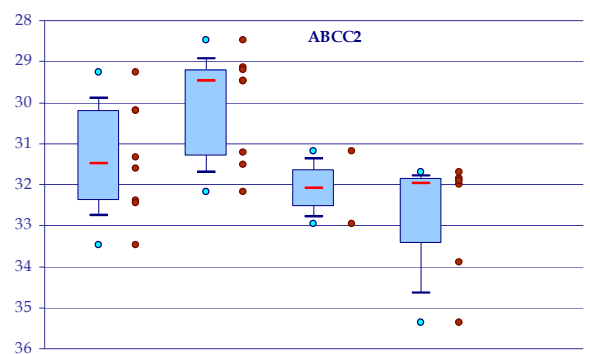
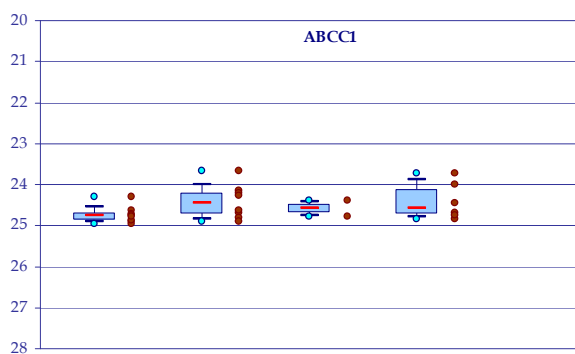
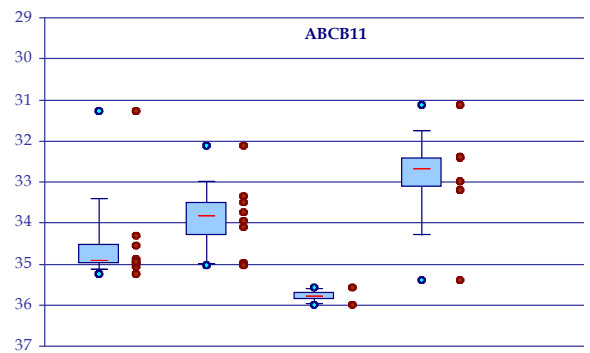
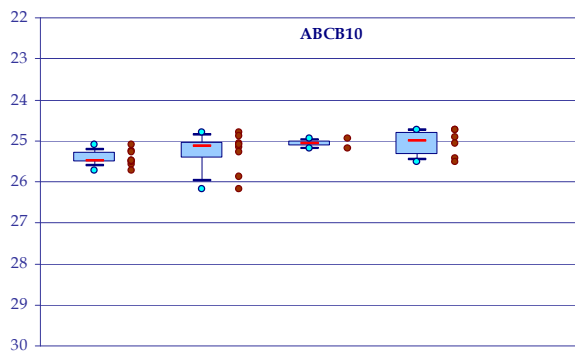
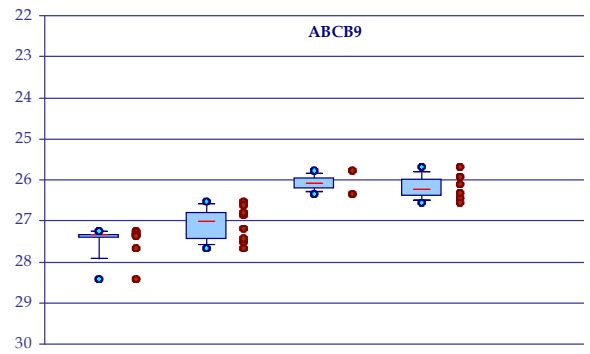
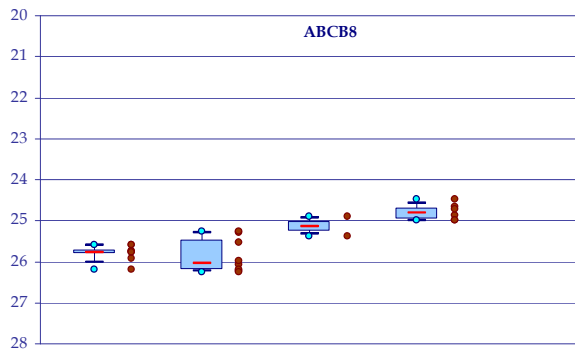
ES EB ES-MSC MSC

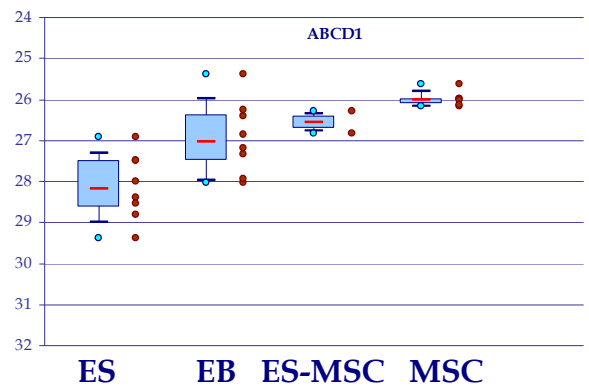
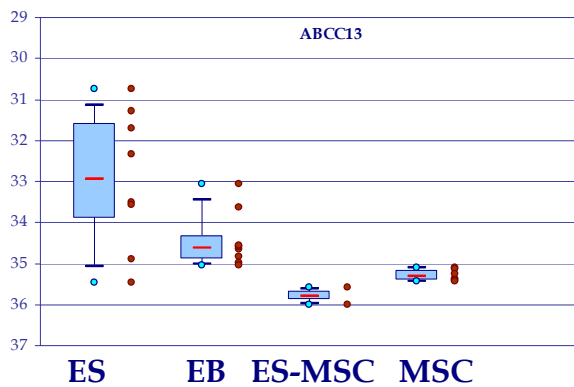
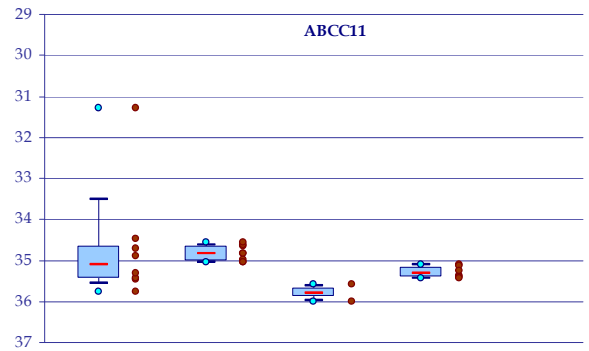
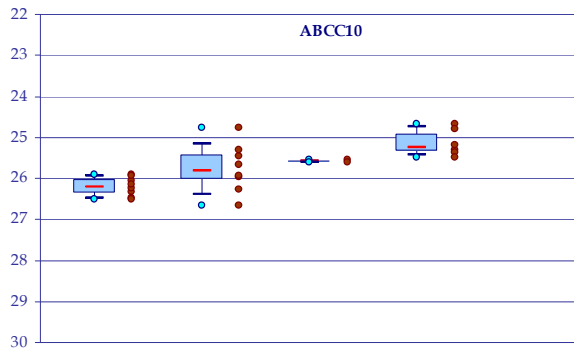
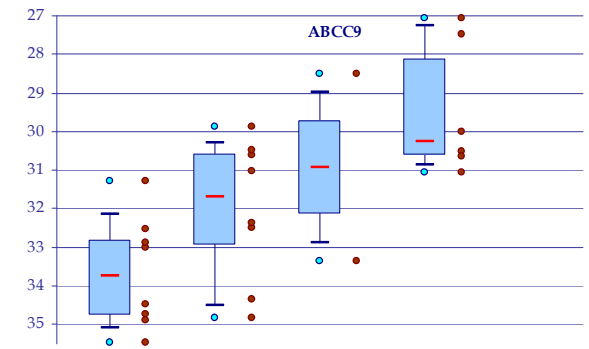
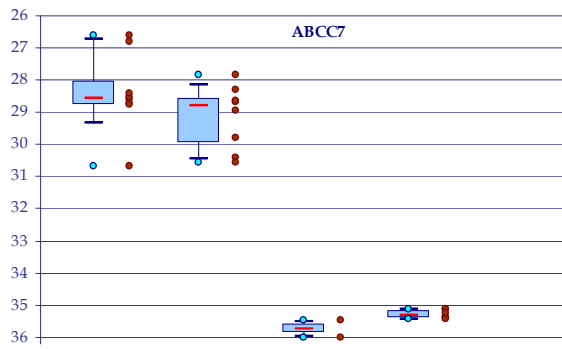
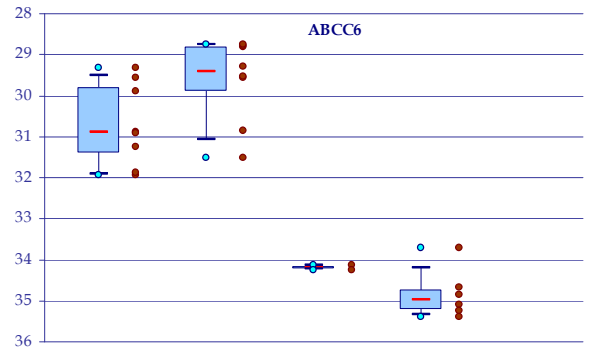
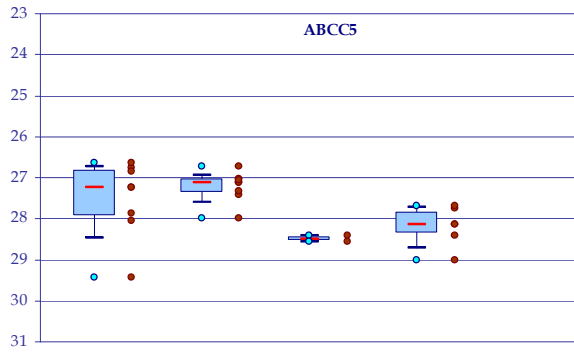
ES EB ES-MSC MSC

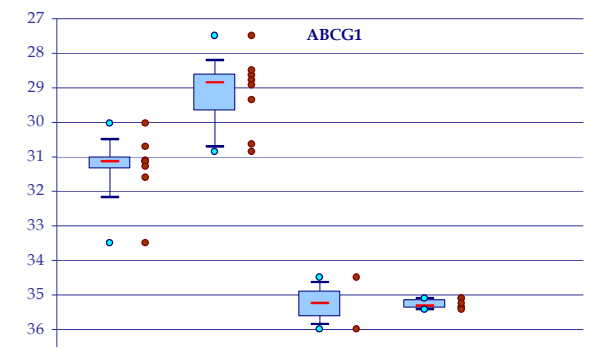
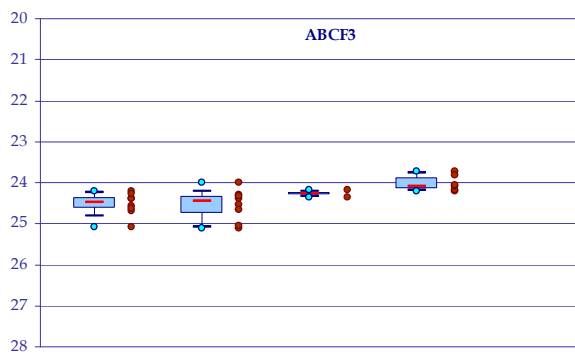
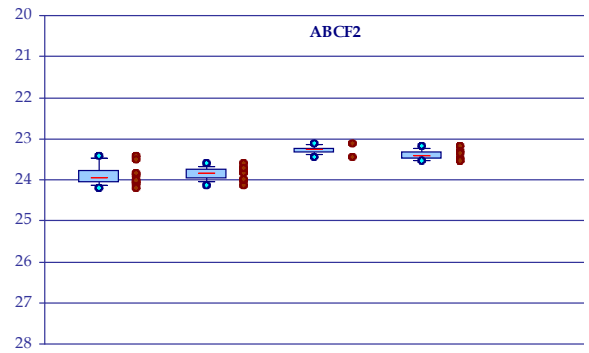
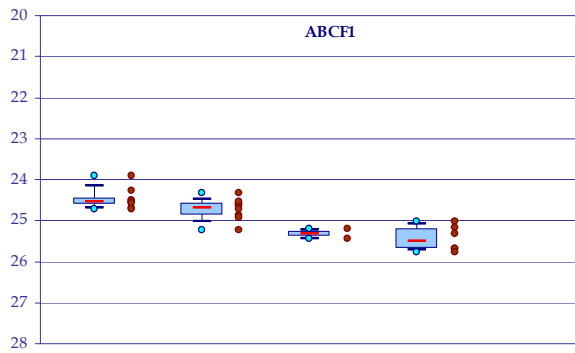
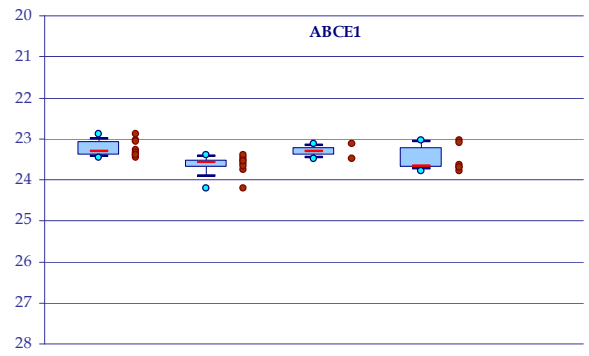
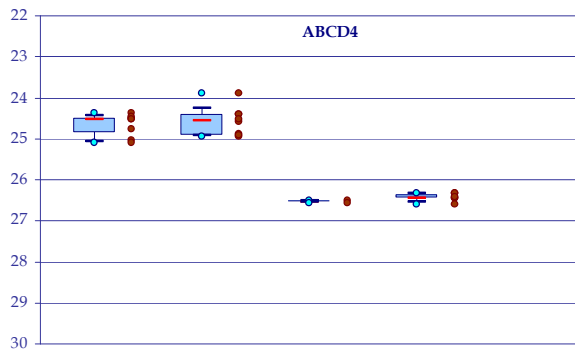
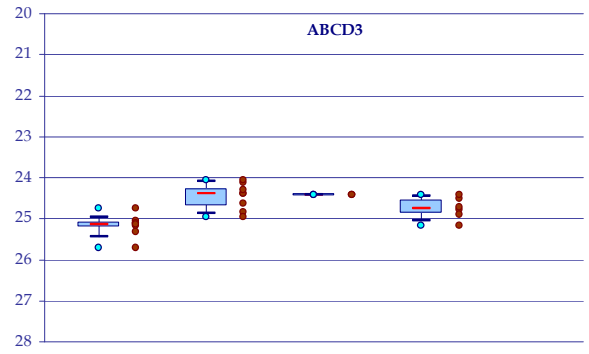
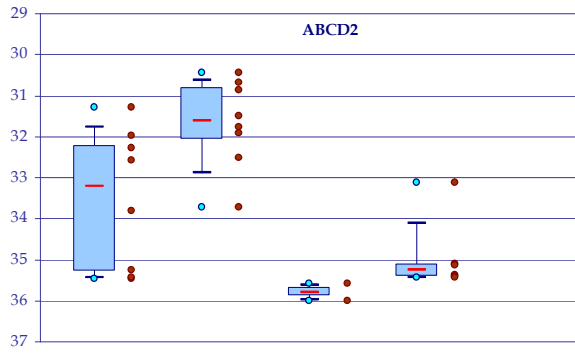


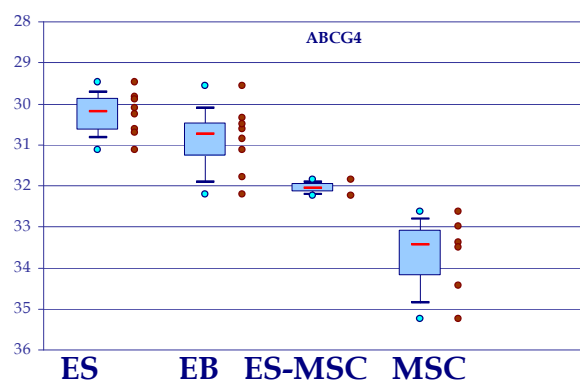
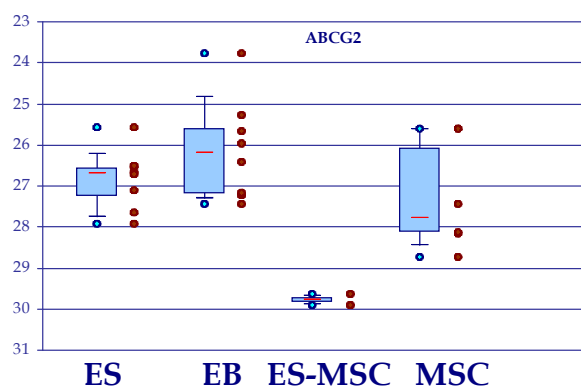
ES EB ES-MSC MSC

ES EB ES-MSC MSC









VII BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, B. L. (2006). "ABCG2 (BCRP): a cytoprotectant in normal and malignant stem cells." Clin Adv Hematol Oncol **4**(1): 63-72.
- Abe-Dohmae, S., Y. Ikeda, M. Matsuo, M. Hayashi, K. Okuhira, K. Ueda, *et al.* (2004). "Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein." J Biol Chem **279**(1): 604-11.
- Ban, N., Y. Matsumura, H. Sakai, Y. Takanezawa, M. Sasaki, H. Arai, *et al.* (2007). "ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis." J Biol Chem **282**(13): 9628-34.
- Barenholz, Y. (2004). "Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications." Subcell Biochem **37**: 167-215.
- Belinsky, M. G., Z. S. Chen, I. Shchavezava, H. Zeng and G. D. Kruh (2002). "Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6)." Cancer Res **62**(21): 6172-7.
- Bezombes, C., N. Maestre, G. Laurent, T. Levade, A. Bettaieb and J. P. Jaffrezou (1998). "Restoration of TNF-alpha-induced ceramide generation and apoptosis in resistant human leukemia KG1a cells by the P-glycoprotein blocker PSC833." Faseb J **12**(1): 101-9.
- Bienengraeber, M., T. M. Olson, V. A. Selivanov, E. C. Kathmann, F. O'Coilain, F. Gao, *et al.* (2004). "ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating." Nat Genet **36**(4): 382-7.
- Boonstra, R., H. Timmer-Bosscha, J. van Echten-Arends, D. M. van der Kolk, A. van den Berg, B. de Jong, *et al.* (2004). "Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation." Br J Cancer **90**(12): 2411-7.
- Bunting, K. D. (2002). "ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells." Stem Cells **20**(1): 11-20.
- Bunting, K. D., J. Galipeau, D. Topham, E. Benaim and B. P. Sorrentino (1998). "Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice." Blood **92**(7): 2269-79.
- Bunting, K. D., S. Zhou, T. Lu and B. P. Sorrentino (2000). "Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo." Blood **96**(3): 902-9.
- Cai, J., J. Chen, Y. Liu, T. Miura, Y. Luo, J. F. Loring, *et al.* (2006). "Assessing self-renewal and differentiation in human embryonic stem cell lines." Stem Cells **24**(3): 516-30.
- Chen, C. J., J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, *et al.* (1986). "Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells." Cell **47**(3): 381-9.
- Chiba, T., K. Kita, Y. W. Zheng, O. Yokosuka, H. Saisho, A. Iwama, *et al.* (2006). "Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties." Hepatology **44**(1): 240-51.
- Clement, J. P. t., K. Kunjilwar, G. Gonzalez, M. Schwanstecher, U. Panten, L. Aguilar-Bryan, *et al.* (1997). "Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits." Neuron **18**(5): 827-38.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Germann, U. A., T. C. Chambers, S. V. Ambudkar, T. Licht, C. O. Cardarelli, I. Pastan, *et al.* (1996). "Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells." J Biol Chem **271**(3): 1708-16.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner and R. C. Mulligan (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-806.
- Gros, P., J. Croop and D. Housman (1986). "Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins." Cell **47**(3): 371-80.

- Guo, Y., M. Lubbert and M. Engelhardt (2003). "CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies." *Stem Cells* **21**(1): 15-20.
- Hirschmann-Jax, C., A. E. Foster, G. G. Wulf, J. G. Nuchtern, T. W. Jax, U. Gobel, *et al.* (2004). "A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(39): 14228-33.
- Hopper-Borge, E., Z. S. Chen, I. Shchavezleva, M. G. Belinsky and G. D. Kruh (2004). "Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel." *Cancer Res* **64**(14): 4927-30.
- Inagaki, N., T. Gono, J. P. Clement, C. Z. Wang, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan, *et al.* (1996). "A family of sulfonyleurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels." *Neuron* **16**(5): 1011-7.
- Janvilisri, T., H. Venter, S. Shahi, G. Reuter, L. Balakrishnan and H. W. van Veen (2003). "Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*." *J Biol Chem* **278**(23): 20645-51.
- Johnstone, R. W., E. Cretney and M. J. Smyth (1999). "P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death." *Blood* **93**(3): 1075-85.
- Jonker, J. W., J. Freeman, E. Bolscher, S. Musters, A. J. Alvi, I. Titley, *et al.* (2005). "Contribution of the ABC transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice." *Stem Cells* **23**(8): 1059-65.
- Kehat, I., L. Khimovich, O. Caspi, A. Gepstein, R. Shofti, G. Arbel, *et al.* (2004). "Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* **22**(10): 1282-9.
- Kim, M., H. Turnquist, J. Jackson, M. Sgagias, Y. Yan, M. Gong, *et al.* (2002). "The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells." *Clin Cancer Res* **8**(1): 22-8.
- Koc, O. N., J. Day, M. Nieder, S. L. Gerson, H. M. Lazarus and W. Krivit (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." *Bone Marrow Transplant* **30**(4): 215-22.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, *et al.* (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." *J Clin Oncol* **18**(2): 307-16.
- Kofidis, T., J. L. de Bruin, T. Yamane, L. B. Balsam, D. R. Lebl, R. J. Swijnenburg, *et al.* (2004). "Insulin-like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration." *Stem Cells* **22**(7): 1239-45.
- Kogan, I., M. Ramjeesingh, C. Li, J. F. Kidd, Y. Wang, E. M. Leslie, *et al.* (2003). "CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux." *Embo J* **22**(9): 1981-9.
- Kool, M., M. van der Linden, M. de Haas, G. L. Scheffer, J. M. de Vree, A. J. Smith, *et al.* (1999). "MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6914-9.
- Krishnamurthy, P., D. D. Ross, T. Nakanishi, K. Bailey-Dell, S. Zhou, K. E. Mercer, *et al.* (2004). "The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme." *J Biol Chem* **279**(23): 24218-25.
- Kwik, J., S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M. P. Sheetz and M. Edidin (2003). "Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13964-9.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel, *et al.* (2004). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells." *Lancet* **363**(9419): 1439-41.
- Lee, M. H., Y. S. Cho and Y. M. Han (2007). "Simvastatin Suppresses Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells By Inhibiting RhoA Geranylgeranylation." *Stem Cells*.
- Linsel-Nitschke, P., A. W. Jehle, J. Shan, G. Cao, D. Bacic, D. Lan, *et al.* (2005). "Potential role of ABCA7 in cellular lipid efflux to apoA-I." *J Lipid Res* **46**(1): 86-92.
- Lou, H. and M. Dean (2007). "Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters." *Oncogene* **26**(9): 1357-60.

- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7634-8.
- Matsushita, H., M. Kizaki, H. Kobayashi, H. Ueno, A. Muto, N. Takayama, *et al.* (1998). "Restoration of retinoid sensitivity by MDR1 ribozymes in retinoic acid-resistant myeloid leukemic cells." *Blood* **91**(7): 2452-8.
- McKay, R. (2000). "Stem cells--hype and hope." *Nature* **406**(6794): 361-4.
- McNeish, J. (2004). "Embryonic stem cells in drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* **3**(1): 70-80.
- Meissner, K., B. Heydrich, G. Jedlitschky, H. Meyer Zu Schwabedissen, I. Mosyagin, P. Dazert, *et al.* (2006). "The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart." *J Histochem Cytochem* **54**(2): 215-21.
- Mulugeta, S., J. M. Gray, K. L. Notarfrancesco, L. W. Gonzales, M. Koval, S. I. Feinstein, *et al.* (2002). "Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3." *J Biol Chem* **277**(25): 22147-55.
- Murphy, C. L. and J. M. Polak (2002). "Differentiating embryonic stem cells: GAPDH, but neither HPRT nor beta-tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels." *Tissue Eng* **8**(4): 551-9.
- Norwood, K., R. Y. Wang, C. Hirschmann-Jax, M. Andreeff, M. K. Brenner, M. A. Goodell, *et al.* (2004). "An in vivo propagated human acute myeloid leukemia expressing ABCA3." *Leuk Res* **28**(3): 295-9.
- Pallis, M. and N. Russell (2000). "P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway." *Blood* **95**(9): 2897-904.
- Perrier, A. L. (2005). "[Human embryonic stem cell in Parkinson's disease therapy?]." *Med Sci (Paris)* **21**(1): 11-3.
- Perrier, A. L. and L. Studer (2003). "Making and repairing the mammalian brain--in vitro production of dopaminergic neurons." *Semin Cell Dev Biol* **14**(3): 181-9.
- Piehler, A., W. E. Kaminski, J. J. Wenzel, T. Langmann and G. Schmitz (2002). "Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9." *Biochem Biophys Res Commun* **295**(2): 408-16.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, *et al.* (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." *Science* **245**(4922): 1066-73.
- Robinson, L. J., W. K. Roberts, T. T. Ling, D. Lamming, S. S. Sternberg and P. D. Roepe (1997). "Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts." *Biochemistry* **36**(37): 11169-78.
- Sawicki, W. T., M. Kujawa, E. Jankowska-Steifer, E. T. Mystkowska, A. Hyc and C. Kowalewski (2006). "Temporal/spatial expression and efflux activity of ABC transporter, P-glycoprotein/Abcb1 isoforms and Bcrp/Abcg2 during early murine development." *Gene Expr Patterns* **6**(7): 738-46.
- Scharenberg, C. W., M. A. Harkey and B. Torok-Storb (2002). "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors." *Blood* **99**(2): 507-12.
- Scheffer, G. L., M. Kool, M. de Haas, J. M. de Vree, A. C. Pijnenborg, D. K. Bosman, *et al.* (2002). "Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3." *Lab Invest* **82**(2): 193-201.
- Shirihai, O., B. Attali, D. Dagan and S. Merchav (1998). "Expression of two inward rectifier potassium channels is essential for differentiation of primitive human hematopoietic progenitor cells." *J Cell Physiol* **177**(2): 197-205.
- Silvius, J. R. (2003). "Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems." *Biochim Biophys Acta* **1610**(2): 174-83.
- Smyth, M. J., E. Krasovskis, V. R. Sutton and R. W. Johnstone (1998). "The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 7024-9.
- Sturn, L. (2001). Gene Expression Similarity Investigation Suit (GENESIS), BIOINFORMATICS GRAZ.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, *et al.* (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-7.

- Ueda, T., S. Brenner, H. L. Malech, S. M. Langemeijer, S. Perl, M. Kirby, *et al.* (2005). "Cloning and functional analysis of the rhesus macaque ABCG2 gene. Forced expression confers an SP phenotype among hematopoietic stem cell progeny in vivo." J Biol Chem **280**(2): 991-8.
- van Helvoort, A., A. J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A. H. Schinkel, P. Borst, *et al.* (1996). "MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine." Cell **87**(3): 507-17.
- Vaughan, A. M. and J. F. Oram (2006). "ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL." J Lipid Res **47**(11): 2433-43.
- Wang, N., D. Lan, W. Chen, F. Matsuura and A. R. Tall (2004). "ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9774-9.
- Willems, E., I. Mateizel, C. Kemp, G. Cauffman, K. Sermon and L. Leyns (2006). "Selection of reference genes in mouse embryos and in differentiating human and mouse ES cells." Int J Dev Biol **50**(7): 627-35.
- Wong, J., C. M. Quinn, I. C. Gelissen, W. Jessup and A. J. Brown (2007). "The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation." Atherosclerosis.
- Yang, A. X., J. Mejido, Y. Luo, X. Zeng, C. Schwartz, T. Wu, *et al.* (2005). "Development of a focused microarray to assess human embryonic stem cell differentiation." Stem Cells Dev **14**(3): 270-84.
- Zhou, S., J. J. Morris, Y. Barnes, L. Lan, J. D. Schuetz and B. P. Sorrentino (2002). "Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12339-44.
- Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, *et al.* (2001). "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype." Nat Med **7**(9): 1028-34.

Chapitre VI

Les transporteurs ABC et la chimiorésistance dans les leucémies aiguës myéloblastiques

Chapitre VI : Les transporteurs ABC et la chimiorésistance dans les leucémies aiguës myéloblastiques

I INTRODUCTION

1 Généralités

Au XIX^e siècle, le terme leucémie désignait les patients dont le sang extrait était d'aspect blanchâtre. Rudolf Virchow, un médecin histologiste allemand, fut l'un des premiers à décrire la leucémie en 1847.

La leucémie est caractérisée par une prolifération maligne de précurseurs hématopoïétiques, bloqués à un stade précoce de maturation (blastes). Il en résulte une accumulation de ces blastes dans la moelle, dans le sang, et éventuellement dans d'autres organes.

S'installe alors un tableau d'insuffisance médullaire avec production insuffisante de globules rouges (source d'anémie), de globules blancs normaux, principalement des polynucléaires, (leuconéutropénie, source d'infections graves) et de plaquettes (thrombopénie, source d'hémorragies provoquées ou spontanées).

La transformation maligne peut toucher les précurseurs des différentes lignées sanguines : granulocytaires, monocytaires, lymphoïdes, érythroblastiques, mégacaryocytaires, donnant lieu aux différents types de leucémies aiguës.

Historiquement, on distingue selon la vitesse d'évolution, les leucémies chroniques (LC) qui évoluent sur plusieurs années et les leucémies aiguës (LA) qui entraînent des complications en quelques semaines.

Les leucémies aiguës de l'adulte concernent les lignées lymphoïdes dans 20% des cas (leucémie aiguë lymphoblastique) et les lignées myéloïdes dans 80% des cas (leucémie aiguë myéloblastique (LAM)) (Zenhäusern et al. 2003).

2 Etiologie

Avec une incidence globale de l'ordre de 3 pour 100.000 habitants par an en France, les LAM sont pour la majorité des pathologies de l'adulte (80% des LA de l'adulte et

20% des LA de l'enfant). Leur incidence augmente régulièrement avec l'âge : jusqu'à 13 pour 100.000 habitants chez les personnes de plus de 65 ans. L'âge médian de survenue est de 65 ans, ce qui rend compte de leur fréquence chez les sujets âgés, terrain où elles ne peuvent pas être traitées de manière conventionnelle en raison de la toxicité des chimiothérapies utilisées.

Les facteurs étiologiques reconnus sont génétiques et environnementaux.

2.1 Facteurs génétiques

Plusieurs affections constitutionnelles prédisposent au risque de leucémie aiguë. Le principal facteur génétique est la trisomie 21, qui expose à un risque nettement accru de LAM (fréquemment de la lignée mégacaryocytaire).

La neurofibromatose de type I (maladie de Recklinghausen), beaucoup plus rare, expose également à un risque élevé de LAM chez le petit enfant. Certaines formes constitutionnelles très rares d'aplasie médullaire (comme l'anémie de Fanconi) évoluent fréquemment en LAM. Enfin, plusieurs syndromes prédisposent à un risque de leucémie aiguë (syndrome de Shwachman, syndrome de Kostmann, syndromes des cassures chromosomiques (Anémie de Fanconi; syndrome de Bloom; ataxie-télangiectasies ; xeroderma pigmentosum..)).

2.2 Facteurs environnementaux

Une exposition à des toxiques peut être à l'origine de leucémie.

Le principal toxique incriminé est le benzène, dont l'exposition obéit toutefois à des règles strictes mais qui reste par exemple présent dans l'essence sans plomb. L'action leucémogène du benzène est connue depuis de nombreuses années en raison de l'augmentation de fréquence des leucémies aiguës en cas d'exposition professionnelle chronique.

Suite à une exposition prolongée à un agent alkylant, une leucémie aiguë peut survenir en moyenne 3 à 7 ans après l'exposition.

Le rôle des radiations ionisantes est également bien démontré, aussi bien chez les survivants d'explosion atomique que chez les sujets exposés professionnellement aux risques radiologiques.

Le tabagisme et l'utilisation fréquente de pesticides et herbicides semblent associés à un risque accru de LA.

On a enfin montré que, dans certaines LAM du nourrisson, principalement avec anomalie cytogénétique en 11q23, cette anomalie était présente dès la naissance et semblait résulter d'une exposition maternelle à certaines substances toxiques de l'alimentation, comme des aflatoxines.

3 Symptômes et diagnostic

3.1 Etats pré-cliniques

Les LAM du sujet âgé et les LAM induites par les agents alkylants sont très souvent précédées par une phase pré-leucémique appelée syndrome myélodysplasique (SMD, autrefois appelé anémie réfractaire). Ce syndrome comporte une insuffisance médullaire, où les précurseurs médullaires meurent par apoptose avant d'atteindre le stade de cellules matures. La moëlle comporte alors des anomalies morphologiques particulières (myélodysplasie) et souvent un excès de blastes (anémie réfractaire avec excès de blastes) (Lowenberg *et al.* 1999).

3.2 Signes cliniques

Les plaintes du patient sont peu spécifiques et durent généralement depuis quelques semaines. Les symptômes principaux sont un syndrome grippal, des infections des voies respiratoires supérieures, un état fébrile, une fatigue. Plus rarement ils concernent des hémorragies.

L'examen clinique n'a souvent rien de particulier (il peut y avoir un syndrome tumoral, en particulier une atteinte neurologique centrale, rate, foie et gencives). Seul l'examen du sang et de la moelle osseuse permet de porter le diagnostic.

3.3 Diagnostic hématologique

L'hémogramme

C'est la formule sanguine pathologique qui met sur la piste du diagnostic. Il traduit les conséquences de l'insuffisance médullaire. Elle montre le plus souvent une baisse de l'hémoglobine (anémie), des plaquettes (thrombopénie) et des polynucléaires (polynucléaires neutrophiles $<1.500/\text{mm}^3$: neutropénie). On observe une blastose sanguine d'importance variable. Lorsqu'elle est importante, elle détermine une hyperleucocytose (leucocytes $>10.000/\text{mm}^3$), pouvant dépasser $100.000/\text{mm}^3$. A l'opposé, les blastes peuvent être absents du sang circulant, ou en très petit pourcentage, et l'hémogramme montre alors une leucopénie (leucocytes $<4000/\text{mm}^3$).

Le myélogramme

La ponction médullaire est absolument indispensable au diagnostic cytologique, elle permet également les études indispensables cytogénétiques, immunologiques et moléculaires.

L'examen cytologique montre un pourcentage de blastes malins par définition supérieur à 20 %, en fait souvent 50%. Les lignées normales (granuleuses, érythroïdes, mégacaryocytaires, lymphocytaires) sont diminuées quantitativement.

Les examens cytogénétiques des blastes permettent de démontrer des anomalies chromosomiques numériques ou structurales chez environ 60% des patients avec LAM. Les altérations cytogénétiques sont les facteurs pronostiques les plus importants.

Les critères morphologiques et cytogénétiques sont à l'origine de la classification internationale Franco-Américano-Britannique FAB (Tableau 11) (Bene *et al.* 1995).

FAB	Fréquence	Cytogénétique
LAM 0 : leucémie minimalement différenciée	3%	
LAM 1 : leucémie à myéloblastes	15-20%	
LAM 2 : leucémie à myéloblastes matures	25-30%	t(8 ;21) (40%)
LAM 3 : leucémie à promyélocytes	5-10%	t(15 ;17) (98%)
LAM 3v : leucémie variante microgranulaire		
LAM 4 : leucémie myélomonocytaire	20%	11q23 (20%)
LAM 4Eo : idem avec éosinophiles anormaux	5-10%	inv(16) (80%)
LAM 5 : leucémie monocytaire	2-9%	11q23 (20%)
LAM 6 : leucémie érythrocytaire	3-5%	
LAM 7 : leucémie à mégacaryocytes	3-12%	

Tableau 11 : Classification FAB des leucémies myéloïdes aiguës

3.4 Facteurs de pronostic

Une fois le diagnostic établi, un traitement adapté, basé sur une chimiothérapie peut commencer.

Différents facteurs pronostiques influent sur la réussite du traitement (Leith *et al.* 1997; Legrand *et al.* 1999; Lowenberg 2001). Deux facteurs de pronostic sont bien identifiés (Tableau 12).

L'âge

La probabilité de rémission complète diminue régulièrement avec l'âge. Dans les séries pédiatriques le taux de rémission est voisin de 80 %. Il est de 60 à 70 % chez les patients âgés de 30 à 50 ans et inférieur à 50 % après 60 ans.

Parmi les traitements les plus efficaces, la cytosine arabinoside à fortes doses et l'allogreffe de moelle ne sont pas utilisables après 60 ans, ce qui, ajouté à une plus faible probabilité de rémission complète, explique le pronostic très défavorable après cet âge.

Le caryotype médullaire

Le caryotype médullaire est un facteur dont la valeur pronostique est maintenant très largement confirmée. On sait actuellement qu'une translocation (8;21) observée surtout dans les LAM 2, une inversion péricentrique du chromosome 16 observée dans la LAM 4 avec éosinophiles sont des éléments de bon pronostic lorsque ces

anomalies sont isolées. Il en est de même de la translocation (15;17) dans les LAM 3. A l'inverse les délétions partielles ou totales des chromosomes 5 et 7 et les anomalies 11q23 sont de mauvais pronostic.

Autres facteurs

L'existence d'une phase préleucémique (syndrome myélodysplasique) réduit la probabilité de rémission. Une hyperleucocytose (leucocytes > 20.000/mm³) augmente le risque de leucostase (agrégation intravasculaire anormale de leucocytes) pouvant affecter le cerveau et les poumons. Enfin une réponse thérapeutique retardée, c'est-à-dire l'obtention d'une rémission après le deuxième cycle d'induction corrèle avec un taux de récurrence plus élevé.

Pronostic	Faible risque	Risque intermédiaire	Haut risque
Cytogénétique	t(8 ;21) ; inv(16) ; t(15 ;17)	Caryotype normal +8 ; +21 ; +22 del(7q) ; del(9q) Autres anomalies	- 5 ; del(5q) ; -7 ; 11q23 ; t(6 ;9) ou présence de plus de 3 anomalies dans le caryotype (caryotype complexe)
Age	< 60 ans	-	> 60 ans
Leucocytose	< 20.000/mm ³	-	> 20.000/mm ³
Temps de latence jusqu'à RC	-	-	RC tardive après le 2 ^{ème} cycle

Tableau 12 : Facteurs pronostiques des LAM

RC : rémission complète

La prise en compte de ces différents facteurs pronostiques est à l'origine de thérapies plus spécifiques en fonction du risque. En conséquence, le pronostic des patients atteints de leucémies aiguës s'est considérablement amélioré durant les vingt dernières années.

4 Traitements

Les options thérapeutiques sont multiples et dépendent de facteurs cliniques (âge, état général), hématologiques (cytologie sanguine et médullaire) et cytogénétiques. Le traitement est à visée curative, c'est-à-dire qu'il cherche à induire des rémissions à long terme.

Le traitement des leucémies aiguës reste basé sur la chimiothérapie, parfois associée à la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Il comprend deux phases, le traitement d'induction et le traitement de consolidation une fois la rémission obtenue (Figure 53).

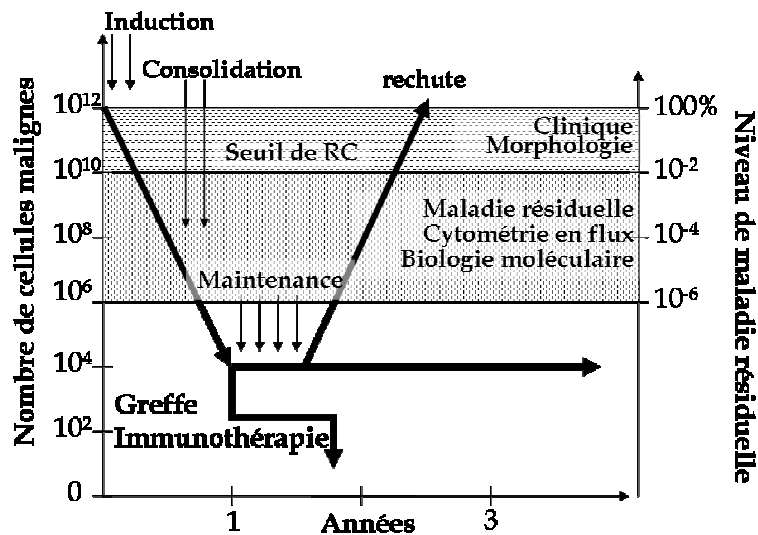


Figure 53 : CONCEPT DE MALADIE RESIDUELLE : la masse tumorale au diagnostic est estimée à 10^{12} cellules. La rémission complète (RC) obtenue après le traitement d'induction équivaut à une réduction d'au moins 2 Log. A ce stade la maladie résiduelle reste détectable par cytométrie en flux jusqu'à - 4 Log et par biologie moléculaire jusqu'à - 6 Log. Après traitement de consolidation puis durant la « maintenance », la maladie peut disparaître, rester à l'état quiescent ou rechuter.

L'induction standard depuis 30 ans est l'association d'anthracycline (généralement daunorubicine) et parfois d'autres intercalants comme la mitoxantrone et un analogue nucléosidique, la cytosine-arabine (Ara-C).

Le but du traitement d'induction est d'obtenir une rémission hématologique après un ou deux cycles de chimiothérapie. L'examen d'une nouvelle ponction médullaire et de l'hémogramme va permettre de juger de l'efficacité de ce premier traitement d'induction. La rémission complète (RC) correspond à la normalisation de l'hémogramme ou au moins à l'obtention de plus de 1000 polynucléaires neutrophiles par mm^3 et plus de 100.000 plaquettes, sans cellule anormale circulante avec blastose médullaire $<5\%$. La rémission partielle (RP) correspond à la normalisation de l'hémogramme avec blastes médullaires compris entre 6 et 15%. L'échec est défini par plus de 15% de blastes médullaires en général associé à un hémogramme pathologique.

La disparition des cellules leucémiques du sang et de la moelle osseuse ne signifie pas que toutes les cellules tumorales ont été éliminées. Il persiste une maladie résiduelle détectable par des techniques sensibles (cytométrie en flux, PCR). Pour cette raison les protocoles de chimiothérapie proposent des traitements de "consolidation" de cette rémission. Ils consistent en l'administration aux patients de fortes doses de chimiothérapie, basées toujours sur la cytosine-arabine et une anthracycline.

Après ce traitement de consolidation, une "intensification" est proposée chez le sujet jeune à risque : il n'y a actuellement pas de consensus sur le meilleur traitement

permettant d'éviter des rechutes : allogreffe, autogreffe ou plusieurs cures de chimiothérapie proches ou identiques à la consolidation.

Malgré les traitements de consolidation et d'intensification, le risque de rechute reste élevé. Ces rechutes surviennent généralement dans les deux premières années qui suivent la mise en rémission. Elles sont plus souvent réfractaires au traitement, et le sont d'autant plus qu'elles surviennent précocement. Il n'y a pas de traitement "standard" de ces rechutes. Si elles surviennent tardivement, un traitement analogue à celui donné lors de l'induction peut être proposé.

Cas particulier : LAM3

La leucémie promyélocytaire aiguë est un sous-type particulier représentant 5 à 10% des LAM. Elle se caractérise par des hémorragies diffuses dues à des troubles de coagulation, et sur le plan cytologique par des cellules présentant une morphologie particulière (promyélocytes avec "corps d'Auer en fagots"). Elle est due à une anomalie chromosomique acquise (translocation entre le chromosome 15 et le chromosome 17), qui implique le récepteur de la vitamine A (acide rétinoïque). L'adjonction de fortes doses d'acide tout-transrétinoïque (ATRA) à la chimiothérapie (daunorubicine et Ara-C) permet de contrôler très vite les troubles de la coagulation et d'obtenir une rémission complète dans plus de 95 % des cas (Fenaux *et al.* 2001).

5 Leucémies et rôle des transporteurs ABC dans les mécanismes de multirésistance aux chimiothérapies

La résistance à la chimiothérapie est un obstacle majeur au succès des traitements des leucémies aiguës myéloblastiques. L'échec de traitements peut être dû au développement de multirésistance aux drogues (MDR), dont les mécanismes incluent vraisemblablement la surexpression de transporteurs ABC membranaires impliqués dans l'export d'agents cytotoxiques utilisées en chimiothérapie (Ross 2004). Dans les leucémies, la résistance multiple aux chimiothérapies est souvent attribuée aux transporteurs présents dans la membrane plasmique. Plusieurs transporteurs sont supposés jouer un rôle dans les leucémies aiguës (Ross 2000). Les plus fréquemment cités sont ABCB1, ABCC1 et ABCG2.

Les spécificités de substrats de ces trois transporteurs sont distinctes, mais peuvent aussi se chevaucher : la daunorubicine peut être transportée par ABCB1, ABCC1 et ABCG2 ; l'étoposide à la fois par ABCB1 et ABCC1 ; la mitoxantrone par ABCG2 et en moindre mesure par ABCB1. Plusieurs études semblent montrer que ABCB1/MDR1 ne transporte pas l'Ara-C (Hait *et al.* 1993 ; Galimberti *et al.* 2003 ; Sarkar *et al.* 2005). Cependant, une étude récente observe que des cellules HL60 exprimant MDR1 sont plus résistantes que la lignée sensible (Baran *et al.* 2006). ABCG2 et ABCC1 ne semblent pas transporter l'Ara-C (Lorico *et al.* 1996; Stam *et al.* 2004).

Le premier transporteur identifié, et le plus étudié est ABCB1/MDR1. La surexpression d'ABCB1 dans des lignées cellulaires, *in vitro*, confère une résistance à un large spectre d'anticancéreux, parmi lesquels des agents utilisés dans les traitements de LAM. Les hémopathies malignes, telles que les LAM, les leucémies aiguës lymphoblastiques, les lymphomes et les myélomes expriment habituellement de faibles taux de P-gp au diagnostic, et sont initialement sensibles aux chimiothérapies (Leith *et al.* 1999).

Certaines études montrent que lors d'une rechute les niveaux d'expression de P-gp peuvent être plus élevés, et que les tumeurs ont développé une résistance accrue (Leith *et al.* 1999). Dans d'autres études, l'augmentation de l'expression de la P-gp au diagnostic initial ou à la rechute lors d'une LAM sont des facteurs prédictifs d'une faible réponse à la chimiothérapie ou d'un faible résultat en terme de survie (Leith *et al.* 1997; van den Heuvel-Eibrink *et al.* 1997; Wuchter *et al.* 2000). Cependant pour Wilson et ses collaborateurs, ABCB1 est également surexprimé dans le groupe de patients réfractaires, mais ABCB1 seul ne différencie pas significativement ce groupe par rapport à d'autres patients LAM (Wilson *et al.* 2006).

Le cas d'ABCC1 semble plus controversé. De premières études montrent que l'expression de MRP1 augmente avec la progression de la maladie dans les LAM (Hart *et al.* 1994; Schneider *et al.* 1995; Zhou *et al.* 1995), mais des études plus récentes n'ont pas trouvées de corrélation entre l'expression de MRP1 et la réponse clinique dans les LAM (Filipits *et al.* 1997; Filipits *et al.* 1999).

Un transporteur plus récemment décrit pourrait également jouer un rôle dans la chimiorésistance, il s'agit d'ABCG2. L'expression d'ABCG2 et son rôle dans les LAM sont très controversés.

Des niveaux relativement élevés d'ABCG2 ont été observés dans environ un tiers d'un groupe à haut risque de patients atteint de LAM, et ne corrèlent pas avec l'expression d'ABCB1. Ceci suggère qu'ABCG2 pourrait induire une résistance à des agents thérapeutiques en l'absence d'ABCB1 (Ross *et al.* 2000). Par des techniques de PCR quantitative, une équipe montre que l'expression d'ABCG2 pourrait corrélérer avec un mauvais pronostic dans des LAM de l'enfant (Steinbach *et al.* 2002).

De plus dans une étude de 20 paires d'échantillons prélevés au diagnostic et à la rechute, on constate une augmentation de l'expression de l'ARN messager de BCRP à la rechute ou lors de LAM réfractaire (van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2002).

Steinbach et ses collaborateurs ont trouvé une expression médiane d'ABCG2 plus élevée dans 24 LAM pédiatriques qui n'arrivent pas à la rémission complète après la première induction comparés à 21 patients qui ont une rémission complète (Steinbach *et al.* 2002). Enfin, selon Wilson et ses collaborateurs, la surexpression d'ABCG2 pourrait suggérer un rôle dans la chimiorésistance éventuellement en combinaison avec ABCB1 (Wilson *et al.* 2006). Cependant, les études utilisant des essais fonctionnels ou la détection immunologique de la protéine BCRP trouvent de

faibles taux d'expression de BCRP dans les blastes leucémiques, et ne voient pas d'augmentation d'expression de BCRP lors de la rechute.

Enfin, certains transporteurs ABC n'étant pas connus pour jouer un rôle dans la résistance aux chimiothérapies ont été récemment cités comme pouvant jouer un rôle dans les leucémies.

Une étude récente utilisant les microarrays, a identifié quatre transporteurs qui seraient surexprimés chez les patients LAM comparés avec des ponctions de moelles osseuses de patients sains. Il s'agit d'ABCA2, ABCA3, ABCB2 et ABCC10. Parmi ces quatre transporteurs, le plus important semble être ABCA3, dont l'expression est trois fois plus importante chez 21 patients n'ayant pas eu de rémission complète après le premier cycle de chimiothérapie, comparés à 21 patients ayant eu une rémission complète (Steinbach *et al.* 2006).

Jusqu'ici, l'impact différentiel de l'expression de gènes de résistance sur des résultats de traitement dans les LAM n'est pas clair. Bien que le rôle des transporteurs ABC dans la résistance aux chimiothérapies dans les LAM soit admis, la réelle implication des transporteurs connus dans la résistance (ABCB1, ABCC1, ABCG2...) ou d'autres transporteurs non étudiés jusqu'alors reste encore à déterminer clairement.

Le profil d'expression de gènes est une méthode puissante pour étudier l'hétérogénéité biologique des LAM. Pour déterminer les gènes exprimés ou réprimés responsables de la résistance aux cytostatiques, la PCR quantitative est une méthode très sensible. Cette technique, utilisée à haut débit, sur des échantillons diagnostiques de ponctions de patients atteints de LAM sur l'ensemble des transporteurs ABC pourrait nous permettre de mieux connaître les profils d'expression de ces LAM, d'inclure de nouveaux paramètres dans les mécanismes de leucémogénèse et d'affiner la classification des risques et les cibles thérapeutiques dans les LAM.

II METHODES

1 Patients LAM testés et définition de groupes

Ce travail a été effectué en collaboration avec l'équipe du Professeur Jean-Pierre Marie (Département d'Hématologie et Oncologie Médicale - Hôtel Dieu et INSERM U936) qui nous a fourni des ARN provenant de blastes de patients ayant déclaré une leucémie aigue myéloblastique diagnostiquée entre 1996 et 2005. Ces blastes ont été obtenus par ponction sternale ou iliaque, au diagnostic initial, avant la thérapie.

L'étude incluait initialement 56 patients ; nous avons décidé d'enlever de l'analyse 5 patients dont le suivi nous paraissait trop court pour évaluer la réponse clinique. Nous avons ensuite défini, sur la base des résultats du traitement de ces 51 patients, deux groupes : le groupe des patients sensibles à la chimiothérapie et le groupe de

patients résistants. Pour cela, nous avons évalué pour chaque individu le temps de survie sans récurrence (Disease Free Survival, DFS). La DFS est définie comme le temps entre la première rémission complète et la première rechute ou la date de dernière nouvelle si le patient n'a pas rechuté. Les patients évalués résistants sont les patients réfractaires au premier traitement. C'est-à-dire ceux n'ayant pas eu de rémission complète après ce premier traitement (RP), ceux pour lesquels une deuxième induction a été nécessaire pour obtenir une rémission (P1R) ou ceux dont la DFS est inférieure à 3 mois. Les patients sensibles correspondent aux autres patients, nous nous sommes assuré que leur DFS était supérieure à 6 mois (Tableau 13).

Résistants	- réfractaires au premier traitement (RP) - nécessité de double induction au premier traitement (P1R) - DFS < 3 mois
Sensibles	- DFS > 6 mois

Tableau 13 : Critères de définition de résistance des patients à la chimiothérapie

		Sensibles	Résistants
Age médian au diagnostic	50 (17-78)	48 (17-78)	52 (19-73)
Sexe			
Femme	30	20	10
Homme	21	11	10
Sous-types FAB			
M0	0	0	0
M1	20	10	10
M2	11	8	3
M3	1	1	0
M4	7	6	1
M5	8	5	3
M6	4	1	3
M7	0	0	0
Cytogénétique			
Favorable	11	11	0
Intermédiaire	26	14	12
Défavorable	14	6	8

Tableau 14 : Caractéristiques des patients, pronostic avant chimiothérapie.

Les différentes caractéristiques de ces patients (âge, sexe, cytogénétiques, classification internationale FAB, ainsi que le pronostic avant le traitement) sont décrit dans le Tableau 14.

2 Outils, méthodes et normalisation des expériences de qPCR

Trois types de TLDA ont été utilisées dans cette étude. Dans un premier temps nous avons utilisé des plaques contenant 49 sondes de transporteurs ABC et 4 sondes de gènes de référence (TLDA-Abc1). Nous avons ensuite utilisé des plaques contenant 16 sondes de gènes de référence (TLDA-Ménage). Pour finir, nous avons dessiné des plaques contenant 45 transporteurs et 9 gènes de référence (TLDA-Abc3) (Tableau 15).

2.1 Transporteurs ABC étudiés

Dans un test préliminaire (TLDA-Abc1) nous avons mesuré l'expression des 49 transporteurs ABC humains sur 24 patients. De cette première analyse, nous avons vu que certains transporteurs ABC n'étaient jamais exprimés. Pour notre série de plaques TLDA-Abc3, nous avons décidé d'enlever certains transporteurs qui ne nous semblaient pas nécessaires pour cette étude car jamais présents (ABCA12, ABCC8, ABCC12, ABCG5, ABCG8) dans ces échantillons de blastes de patients.

2.2 Choix des gènes de référence

Le choix du gène de référence, utilisé pour la normalisation de données PCR obtenues sur des leucémies, varie selon les publications. Différentes publications ont utilisé la Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase (GAPDH) comme gène de référence (Krauter *et al.* 1999; Kondo *et al.* 2000; Sugahara *et al.* 2004) ; parfois deux gènes de référence sont testés GAPDH et la beta-2-microglobuline (B2M) (Kosugi *et al.* 1999). Récemment, l'hydroxymethylbilane synthase (HMBS) a servi de gène de contrôle pour des PCR effectuées sur des LAM (Scholl *et al.* 2003; Huh *et al.* 2005) ; mais aussi la B2M (Liu *et al.* 2005) ainsi qu'Abelson (ABL1) (Guerrasio *et al.* 2002; Saussoy *et al.* 2004).

Une étude récente sur 250 échantillons de leucémies (aigue et chronique) d'origines très variées sélectionne 3 gènes de référence : ABL1, GUSB, B2M (Beillard *et al.* 2003). Cette publication exclue 12 autres gènes de référence sur la base de présence de pseudogènes ou de leur niveau d'expression. Les trois gènes sélectionnés ne semblent ne pas varier dans leurs échantillons. Les auteurs ne nous donnent pas de d'indication sur la variabilité des autres gènes de contrôle.

TLDA-Abc1	TLDA-Abc3	TLDA-Ménage
ABCA1	ABCA1	-
ABCA2	ABCA2	-
ABCA3	ABCA3	-
ABCA4	ABCA4	-
ABCA5	ABCA5	-
ABCA6	ABCA6	-
ABCA7	ABCA7	-
ABCA8	ABCA8	-
ABCA9	ABCA9	-
ABCA10	ABCA10	-
ABCA12	-	-
ABCA13	ABCA13	-
ABCB1	ABCB1	-
ABCB2	ABCB2	-
ABCB3	ABCB3	-
ABCB4	ABCB4	-
ABCB5	ABCB5	-
ABCB6	ABCB6	-
ABCB7	ABCB7	-
ABCB8	ABCB8	-
ABCB9	ABCB9	-
ABCB10	ABCB10	-
ABCB11	ABCB11	-
ABCC1	ABCC1	-
ABCC2	ABCC2	-
ABCC3	ABCC3	-
ABCC4	ABCC4	-
ABCC5	ABCC5	-
ABCC6	ABCC6	-
ABCC7	ABCC7	-
ABCC8	-	-
ABCC9	ABCC9	-
ABCC10	ABCC10	-
ABCC11	ABCC11	-
ABCC12	-	-
ABCC13	ABCC13	-
ABCD1	ABCD1	-
ABCD2	ABCD2	-
ABCD3	ABCD3	-
ABCD4	ABCD4	-
ABCE1	ABCE1	-
ABCF1	ABCF1	-
ABCF2	ABCF2	-
ABCF3	ABCF3	-
ABCG1	ABCG1	-
ABCG2	ABCG2	-
ABCG4	ABCG4	-
ABCG5	-	-
ABCG8	-	-
18S	18S	18S
B2M	B2M	B2M
GUSB	GUSB	GUSB
ABL	ABL	-
-	HPRT1	HPRT1
-	PPIA	PPIA
-	GAPD	GAPD
-	TBP	TBP
-	TFRC	TFRC
-	-	UBC
-	-	RPLP0
-	-	POLR2A
-	-	HMBS
-	-	ACTB
-	-	IPO8
-	-	YWHAZ
-	-	PGK1

Tableau 15 : transcrits testés sur nos différentes séries de plaques

1ère série de plaques : « TLDA-Abc1 »

Nous avons donc décidé d'utiliser les trois gènes ABL1, GUSB, B2M sur les TLDA. Nous avons ensuite ajouté le 18S qui est un gène de référence classiquement utilisé pour la normalisation de données PCR.

L'étude de ces 4 gènes de référence par Normfinder et GeNorm nous montre que de ces quatre gènes, 18S et B2M sont plus stables dans cette étude. Toutefois, les valeurs de M (pour GeNorm) et les valeurs de variabilité (pour Normfinder) nous paraissent élevées en comparaison de celles que nous obtenons d'habitude (Figure 54)

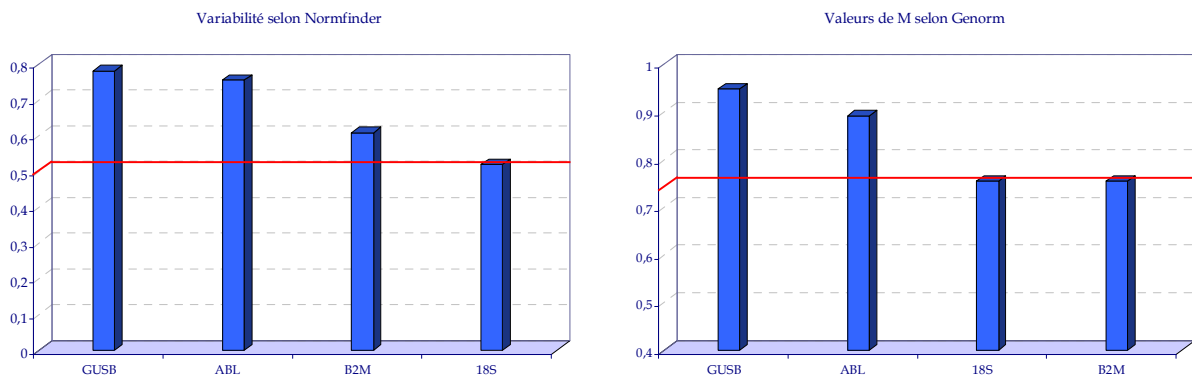


Figure 54 : Classement de 4 gènes de référence.

Test sur 16 gènes de référence : « TLDA-Ménage »

Nous avons donc fait un test sur des TLDA comportant 16 gènes de référence et comprenant 18S, B2M, GUSB, utilisés précédemment. Nous avons testé seulement une partie de nos patients (32 patients) sur ces TLDA et nous avons classé grâce à GeNorm et Normfinder les 16 gènes de référence en fonction de leur variabilité d'expression (Figure 55). Ceci nous a permis de voir comment se comportaient ces trois gènes par rapport aux 13 autres gènes de référence. L'analyse nous montre que GUSB et B2M sont beaucoup plus variables que d'autres gènes de référence. En revanche, le 18S semble assez stable.

Les deux logiciels n'utilisent pas le même algorithme de calcul, et ne donnent pas exactement le même classement. Ils semblent être d'accord pour définir les 3 meilleurs gènes de référence dans cette étude : GAPDH, PPIA, PGK1. Cependant, nous avons préféré éliminer PGK1 pour la normalisation de nos plaques, en effet, la surexpression de PGK1 induirait des phénomènes de multirésistance aux drogues (Duan *et al.* 2002).

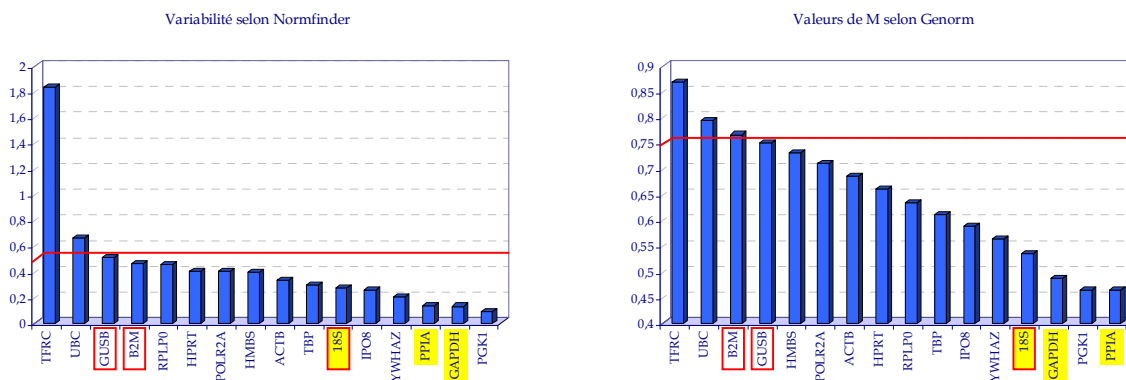


Figure 55 : Classement de 16 gènes de référence

3^{ème} série de plaques : « TLDA-Abc3 »

Pour réaliser notre étude sur les patients LAM, nous avons construit de nouvelles cartes contenant les transporteurs ABC et les 9 gènes de référence suivant :

- 3 gènes cités par Beillard et collaborateurs : GUSB, B2M, ABL (Beillard *et al.* 2003)
- 3 gènes de référence que nous avons sélectionnés dans notre analyse sur 32 patients : 18S, PPIA, GAPDH
- 3 gènes couramment utilisés pour normaliser des données TBP, TFRC, HPRT

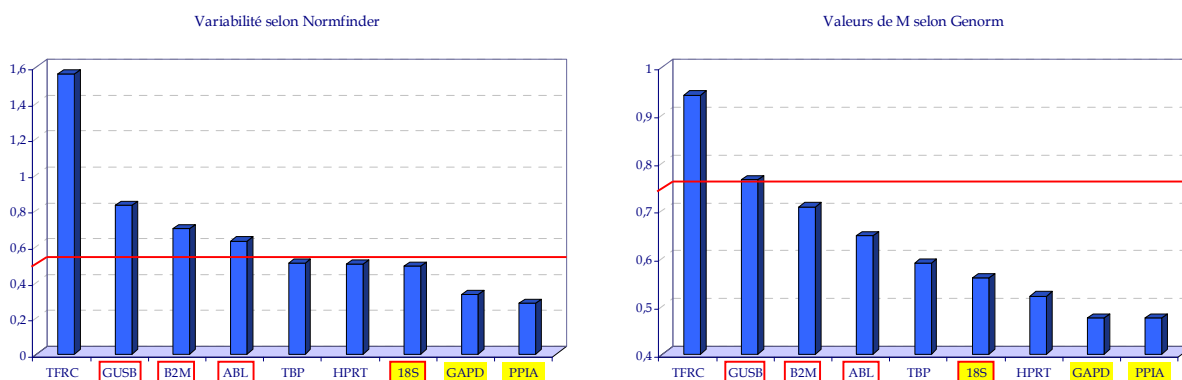


Figure 56 : Classement de 9 gènes de référence

Nous avons analysé ces 9 gènes de référence sur l'ensemble de nos patients (Figure 56). Les gènes les plus stables dans nos échantillons sont GAPDH, PPIA et 18S.

Dans ce type d'étude de PCR quantitative, le choix du gène de référence utilisé pour la normalisation des résultats est primordial. Dans des études de PCR quantitative sur des échantillons de LAM, nous avons vu que de nombreux gènes ont été cités dans la littérature, sans justification. Une étude a été réalisée sur de nombreux échantillons de leucémies (Beillard *et al.* 2003). C'est sur cette étude que nous nous sommes basés pour choisir nos gènes de référence dans la première série de plaque TLDA-Abc1. Dans cette publication, le choix des gènes a été fait sur la base de la présence de pseudogènes et sur leur niveau d'expression. Nous n'avons pas été satisfaits par la stabilité d'expression de ces gènes. C'est pourquoi nous avons mené une étude sur les gènes de référence et nous avons normalisé nos résultats par la moyenne des gènes qui étaient les plus stables dans nos échantillons : GAPDH, PPIA, 18S.

III RESULTATS

1 Profil d'expression des transporteurs ABC dans les LAM

Nous avons tout d'abord voulu représenter l'abondance des 49 transporteurs ABC humains dans les blastes de 51 patients LAM. Ces transporteurs ont des expressions variables. Le profil d'expression est représenté sur la Figure 57.

Les 49 transporteurs ABC testés sont en lignes, et les 51 échantillons en colonnes. Les patients résistants sont regroupés sur la gauche (rectangles roses) et les patients sensibles à droite (rectangles bleus). Chaque rectangle représente la moyenne d'un duplicata de PCR. Les couleurs indiquent le niveau d'expression relatif de chaque transporteur ABC : rouge pour les gènes très exprimés, vert pour les transcrits absents, en passant par le noir pour une expression moyenne (les rectangles gris sont des données manquantes).

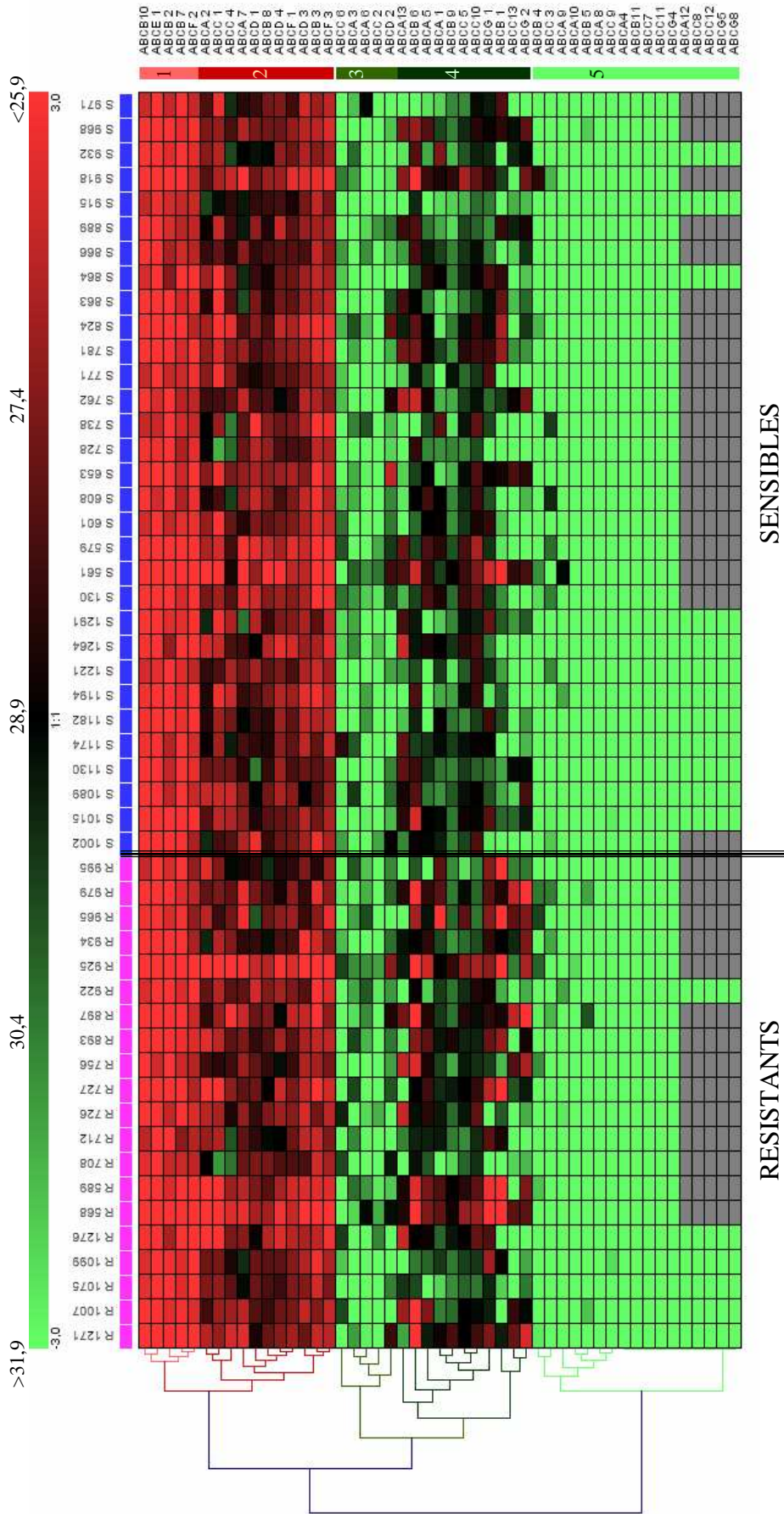


Figure 57 : Profil d'expression des transporteurs ABC dans des échantillons de blastes de patients LAM

Cette figure représente les valeurs de Ct normalisés de chaque échantillon. Cette représentation est centrée sur la valeur médiane de l'ensemble des Ct normalisés de cette expérience. Cette classification hiérarchique (Hierarchical Clustering) a été obtenue en mesurant la distance Euclidienne entre les transporteurs ABC. Le critère d'agrégation des distances utilisé pour la détermination des classes (clusters) est le lien maximum (Complete linkage). Le dendrogramme représente la relation entre les profils d'expression. La longueur des bras est inversement proportionnelle aux similarités des profils d'expression.

Globalement 2 tendances apparaissent suite à cette analyse, nous permettant de distinguer les gènes très bien exprimés de ceux moins bien exprimés. En regardant plus précisément, 5 sous groupes peuvent être distingués.

Les groupes 1 et 2 correspondent à des classes d'ABC très bien exprimés dans les blastes de patients leucémiques. Les niveaux d'expression du groupe 1 (5 gènes) sont très élevés et constants, celles du groupe 2 (11 gènes) peuvent varier selon les individus. Les groupes 3, 4 et 5 sont moins présents. Le groupe 5 (17 gènes) contient des gènes non exprimés dans ces blastes. Le groupe 3 (5 gènes) est constitué de gènes très peu exprimés, mais qui peuvent s'exprimer faiblement dans de rares cas. Enfin le groupe 4 (11 gènes) est constitué de gènes dont l'expression semble varier selon les individus avec un niveau d'expression moyen.

Les groupes 2 et 4, dont les expressions sont variables inter-individus, peuvent contenir des gènes très intéressants pour la suite de l'analyse. En effet, les variations observées pourraient correspondre à une expression différentielle dans les groupes de patients résistants ou sensibles.

2 Quantification relative de chaque transporteur ABC

Nous avons calculé, pour chaque transporteur ABC, l'expression relative du groupe de patients résistants, comparée au groupe de patients sensibles. La Figure 58 représente les ratios d'expression obtenus pour 39 transporteurs ABC (10 transporteurs ont été exclus car leur expression était trop faible).

Dans l'ensemble, on remarque que de nombreux transporteurs ABC ne varient pas significativement entre le groupe de patients sensibles et celui des résistants. Une ligne rouge délimite les facteurs d'augmentation supérieurs ou égaux à 2 auxquels nous nous sommes intéressés. Nous avons alors plus particulièrement étudiés 7 transporteurs : ABCA2, ABCB1, ABCB5, ABCB6, ABCC13, ABCG1 et ABCG2 (Figure 59). Les profils d'expression de ces 7 transporteurs sont représentés dans la Figure 60. On peut remarquer que pour ces transporteurs on a une expression plus importante (couleur rouge) chez les patients résistants. Nous avons calculé les facteurs d'augmentation entre le groupe de patient par rapport au groupe de patients sensibles (Tableau 16).

Afin de vérifier si nos 2 groupes (sensibles et résistants) étaient significativement différents pour l'expression de ces 7 transporteurs, nous avons appliqué le test de Mann & Whitney. Les valeurs du Ct normalisé moyen, de chaque ABC, du groupe de résistants, sont indiquées dans le Tableau 16, ainsi que les résultats des valeurs de p de notre test statistique. ABCB5 étant un gène très peu exprimé Figure 60 (Ct normalisé moyen de 33,72), nous avons préféré l'enlever de notre étude. En revanche, pour nos 6 autres ABC, les Ct obtenus sont suffisamment précoces.

Si l'on décide d'accepter l'hypothèse de nos deux populations différentes au seuil 5%, 5 transporteurs ABC sont exprimés différemment entre notre groupe de sensibles et notre groupe de résistants : ABCA2, ABCB1, ABCC13, ABCG1 et ABCG2.

Parmi ces 5 transporteurs, deux d'entre eux, ABCB1 et ABCG2 sont particulièrement connus pour transporter des cytotoxiques. ABCB6 ne passe pas notre test statistique au seuil 5% mais sa valeur de p (6%) est proche de ce seuil. Cependant d'autres transporteurs sont parfois cités comme transporteurs de cytotoxiques, le plus connu étant ABCC1. Dans notre étude ce transporteur ne varie pas entre nos deux groupes de patients. Si l'on applique un test de Mann et Whitney sur les Ct normalisés de nos deux populations de patients. La valeur de p est d'environ 0,6 (Tableau 16). Nous avons effectué ce test sur 7 autres transporteurs, dont les ratios ne variaient pas. Pour ces transporteurs, les valeurs de p varient de 0,45 à 0,98 indiquant que ces deux populations ont bien des profils identiques.

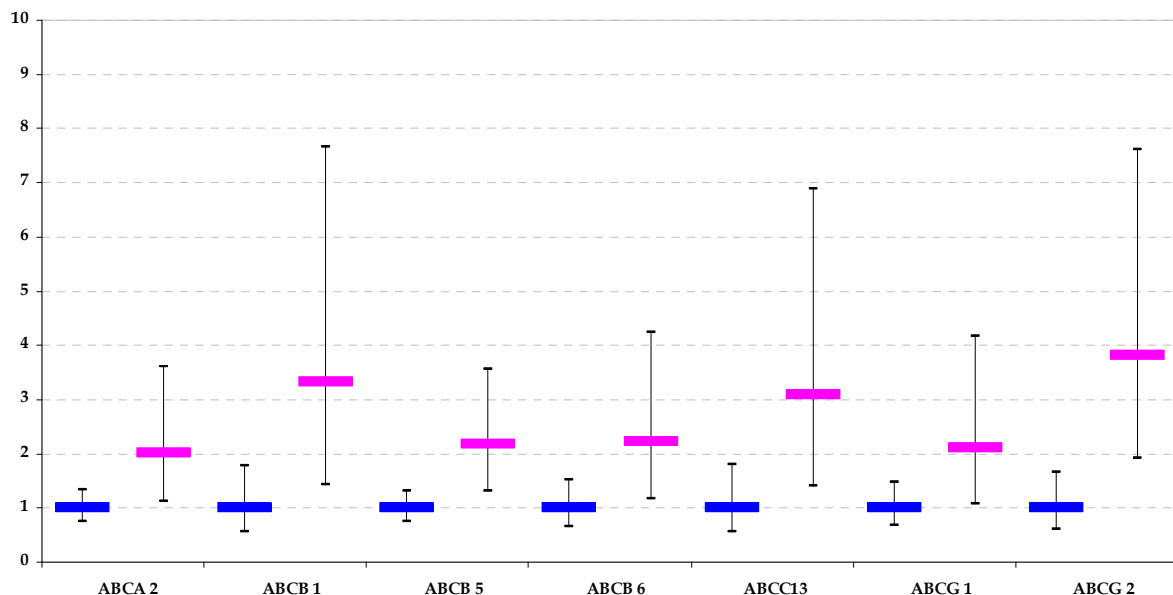


Figure 59 : ratios d'expression de 7 transporteurs ABC qui varient entre nos deux groupes

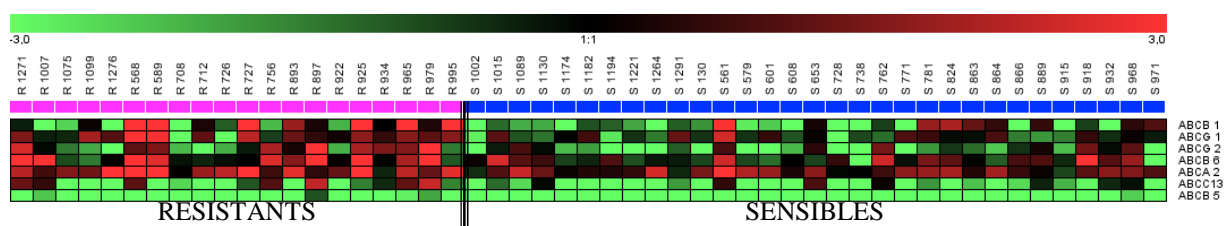


Figure 60 : profils d'expression de 7 transporteurs ABC

	RQ moyen	Ct normalisé moyen du groupe R	P valeur
ABCA2	2,00	26,87	0,0108
ABCB1	3,32	28,88	0,0372
ABCB5	2,17	33,72	0,0071
ABCB6	2,23	27,54	0,0622
ABCC13	3,10	30,48	0,0354
ABCG1	2,11	28,30	0,0016
ABCG2	3,82	28,81	0,0033
ABCA3	1,11	31,63	0,5725
ABCA13	1,06	30,08	0,9771
ABCB2	-1,02	25,71	0,9771
ABCB3	1,04	26,46	0,4495
ABCC1	-1,02	26,92	0,5989
ABCC3	1,05	33,38	0,7380
ABCF2	-1,08	26,31	0,4729
ABCF3	-1,05	26,68	0,4969

Tableau 16 : quantification relative de transporteurs ABC avec (en haut) ou sans (en bas) variations

IV DISCUSSION

- 5 transporteurs ABC sont significativement plus exprimés dans le groupe des patients résistants.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux variations d'expression des transporteurs ABC sur des échantillons de patients ayant déclarés une LAM. Nous avons comparé l'expression en transporteurs ABC des blastes de ces patients avant la chimiothérapie avec leur réponse au traitement. Pour cela, nous avons défini deux groupes de patients, ceux ayant bien répondu au premier cycle de chimiothérapie, et ceux n'ayant pas de rémission ou rechutant rapidement. Ceci nous a permis de sélectionner les transporteurs qui pourraient jouer un rôle dans la résistance des LAM au traitement de chimiothérapie.

Nous avons constaté que parmi nos 49 transporteurs ABC, 5 transporteurs sont significativement plus exprimés dans le groupe de patients résistants. Ces 5 transporteurs sont ABCA2, ABCB1, ABCC13, ABCG1 et ABCG2. Un autre

transporteur, ABCB6 est également surexprimé dans le groupe de patients résistants mais se situe à la limite de notre analyse statistique.

- *ABCB1 - ABCC1 - ABCG2 et la résistance aux traitements des LAM, corrélations et controverses.*

Nos résultats montrent que les deux plus fortes variations d'expression entre nos deux groupes de patients concernent ABCG2 et ABCB1. Les facteurs d'augmentation observés pour le groupe des patients résistants sont de l'ordre de 3 à 4 fois. Par contre, aucune variation n'a été observée pour le transporteur ABCC1.

L'implication d'ABCB1, ABCC1 et ABCG2, sur la réponse thérapeutique dans le cadre de chimiothérapies anticancéreuses, est assez largement admis en raison de leur capacité à transporter des cytotoxiques. Cependant les arguments corroborant ce rôle s'appuient très largement sur des études effectuées *in vitro*, sur des lignées cellulaires. Dans le cas des LAM, quelques études *in vivo* chez l'homme décrivent le rôle de ces transporteurs dans la résistance à la chimiothérapie. Ces études se limitent le plus souvent à rechercher l'un ou l'autre de ces trois transporteurs et les conclusions de ces études sont parfois différentes voire contradictoires.

Des travaux montrent que l'expression d'ABCB1 (Leith *et al.* 1997; Malagola *et al.* 2007) ou celle d'ABCG2 (Steinbach *et al.* 2002) sont associées avec un faible taux de rémission complète des patients. D'autres travaux ont montrés que l'activité de 2 transporteurs comme par exemple ABCB1 et ABCC1 (Legrand *et al.* 1999) induisent une résistance à la chimiothérapie des LAM. Cependant, une absence de corrélation entre l'expression de ces 2 transporteurs et la réponse au traitement a également été décrite (Galimberti *et al.* 2003).

La surexpression d'ABCB1 et ABCG2, que nous avons quantifié et corrélé avec un mauvais pronostic dans nos échantillons, a également été observé dans d'autres travaux (Benderra *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2006; van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2007).

Concernant ABCC1, son rôle dans la résistance des LAM est assez controversé. Il a parfois été associé à une mauvaise réponse à la chimiothérapie (Hart *et al.* 1994; Schneider *et al.* 1995; Zhou *et al.* 1995), cependant d'autres équipes ne trouvent pas de corrélation entre son expression et un mauvais pronostic (Filipits *et al.* 1997; Filipits *et al.* 1999; Damiani *et al.* 2007). Dans nos expériences, nous avons constaté qu'ABCC1 est effectivement bien exprimé dans les blastes des patients LAM, mais que son expression ne variait pas entre nos deux groupes.

Nous proposons donc que la présence d'ABCC1 ne soit pas un facteur pronostique défavorable pour l'efficacité du traitement des LAM contrairement à ABCB1 et ABCG2.

- Un rôle dans la résistance des LAM pour d'autres transporteurs ABC

En dehors des trois transporteurs ABC classiquement impliqués dans la résistance, plusieurs autres transporteurs ABC sont connus pour être capable de transporter des cytotoxiques *in vitro*. De plus, une étude réalisée sur des blastes a proposé que pour certains patients l'efflux de substrats n'était dû ni à ABCB1, ni à ABCC1 mais sûrement à d'autres transporteurs (Leith *et al.* 1999).

Dans nos expériences sur des patients LAM, ABCG2 et ABCB1 ne sont pas les seuls transporteurs qui varient significativement entre nos deux groupes de patients. Quatre autres transporteurs ABC sont associés au phénotype de résistance des patients : ABCA2, ABCB6, ABCC13, ABCG1.

Parmi ces 4 transporteurs, on trouve deux transporteurs de cholestérol ABCA2 et ABCG1. On sait maintenant que le cholestérol ainsi que d'autres lipides jouent un rôle dans l'efflux et la liaison des drogues. De plus la composition en lipides de la membrane cellulaire a un effet sur l'activité de la P-glycoprotéine ou la résistance aux cytotoxiques (Le Moyec *et al.* 2000; Luker *et al.* 2000; Pallares-Trujillo *et al.* 2000; Rothnie *et al.* 2001; Troost *et al.* 2004). Les transporteurs ABCA2 et ABCG1 pourraient donc jouer un rôle dans la résistance des LAM.

ABCA2 est un transporteur qui serait impliqué dans le métabolisme des lipides (Kaminski *et al.* 2001; Ohtsuki *et al.* 2004) et pourrait jouer un rôle important dans la maladie d'Alzheimer (Chen *et al.* 2004; Mace *et al.* 2005). De plus, quelques publications, mettent en évidence son rôle dans la résistance de lignées cellulaires à l'estrámustine (Laing *et al.* 1998) et à la mitoxantrone (Boonstra *et al.* 2004). Enfin deux publications récentes décrivent un possible rôle d'ABCA2 dans la résistance aux cytostatiques dans des lignées leucémiques et constatent une expression élevée dans les blastes de LAM d'enfants (Efferth *et al.* 2006; Steinbach *et al.* 2006).

ABCG1 appartient à la sous-famille G comme ABCG2. Il est impliqué dans le métabolisme des lipides et le transport de cholestérol (Schmitz *et al.* 2001), mais pas dans le transport de cytotoxiques. Cependant, une publication montre qu'ABCG1 est induit suite à une exposition d'hépatocytes à de la rifampicine (Nishimura *et al.* 2002). Jusqu'à présent ce transporteur n'a pas été beaucoup étudié dans les LAM, ni décrit comme facteur de résistance aux cytotoxiques contrairement à ABCA2. La fonction de sa surexpression dans le groupe de patients résistant pourrait donc être liée à son influence sur la composition lipidique de la membrane cellulaire des blastes.

Notre étude sur les LAM a également permis de détecter la surexpression de deux autres transporteurs qui ne sont pas classiquement décrit pour jouer un rôle dans la résistance : ABCC13 et ABCB6.

ABCC13 appartient à la sous-famille C des transporteurs ABC. Cependant sa séquence de référence a récemment été interrompue car le transcrit d'ABCC13 humain serait tronqué. Cette séquence est donc actuellement considérée comme un pseudogène. Ce qui nous empêche de conclure quand au rôle potentiel de ce

transcrit. Cependant, nous avons détecté cet ARN dans le foie fœtal, les cellules souches et les blastes de LAM. Dans la littérature un niveau d'expression élevé de cet ABC a également été décrit dans la moelle osseuse et le foie fœtal (Yabuuchi *et al.* 2002). Récemment, ABCC13 et ABCB6 ont été décrit dans une étude de résistance de cancer mammaire. Ils font partie d'un groupe de gènes surexprimés chez les patients ayant des signes de maladie résiduelle (Park *et al.* 2006). De plus, le gène ABCB6 est amplifié dans 19 lignées résistantes et serait donc impliqué dans la multirésistance aux drogues (Yasui *et al.* 2004). Enfin il est aussi surexprimé dans des tumeurs du foie (Furuya *et al.* 1997).

Ces trois études qui comme nos résultats suggèrent un rôle d'ABCB6 dans la résistance, n'illustrent pas la fonction physiologique connue de ce transporteur. Une étude récente montre qu'ABCB6 est requis pour le transport de la porphyrine (Krishnamurthy *et al.* 2006). Il serait un gène candidat responsable du syndrome GRACILE, un syndrome néonatal létal dû à un désordre des fonctions mitochondriales associées au métabolisme du fer. (Mitsubishi *et al.* 2000).

On pourrait penser que l'induction de transporteurs ABC suite au traitement anticancéreux a beaucoup plus d'importance que leur niveau d'expression au diagnostic. Cependant, deux équipes ont récemment mesuré l'expression des trois transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2 au cours du traitement de chimiothérapie (van den Heuvel-Eibrink *et al.* 2002; van der Pol *et al.* 2003). Aucune variation n'a été observée pour ABCB1 ni pour ABCC1 ; toutefois une équipe voit une très faible augmentation d'ABCG2 à la rechute. Si ces trois transporteurs jouent un rôle dans la chimiorésistance c'est par leur présence intrinsèque au diagnostic. Et c'est à ces niveaux d'expression mesurés juste avant le traitement que nous nous sommes intéressés.

Nous avons constaté qu'ABCB1 et ABCG2, sont bien surexprimés dans le groupe des patients résistants. Mais en plus de ces deux transporteurs, d'autres ABC peu ou pas étudiés dans les LAM ont vu leur expression augmenter : ABCB6, ABCC13, ABCG1 et ABCA2. Ces transporteurs pourraient jouer un rôle très important dans la résistance soit en assurant le transport de cytotoxique, ou en modulant l'activité d'efflux des autres transporteurs, avec des conséquences attendues sur la réponse thérapeutique. Ces variations d'expression chez les patients avant le traitement peuvent expliquer les différences de réponse à la chimiothérapie. Prédire cette réponse par le profil d'expression des transporteurs ABC pourrait permettre d'adapter voir d'améliorer le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques.

V BIBLIOGRAPHIE

- Baran, Y., U. Gunduz and A. U. Ural (2006). "Cross-resistance to cytosine arabinoside in human acute myeloid leukemia cells selected for resistance to vincristine." *Exp Oncol* **28**(2): 163-5.
- Beillard, E., N. Pallisgaard, V. H. van der Velden, W. Bi, R. Dee, E. van der Schoot, *et al.* (2003). "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program." *Leukemia* **17**(12): 2474-86.
- Benderra, Z., A. M. Faussat, L. Sayada, J. Y. Perrot, D. Chaoui, J. P. Marie, *et al.* (2004). "Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias." *Clin Cancer Res* **10**(23): 7896-902.
- Bene, M. C., G. Castoldi, W. Knapp, W. D. Ludwig, E. Matutes, A. Orfao, *et al.* (1995). "Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)." *Leukemia* **9**(10): 1783-6.
- Boonstra, R., H. Timmer-Bosscha, J. van Echten-Arends, D. M. van der Kolk, A. van den Berg, B. de Jong, *et al.* (2004). "Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation." *Br J Cancer* **90**(12): 2411-7.
- Chen, Z. J., B. Vulevic, K. E. Ile, A. Soulika, W. Davis, Jr., P. B. Reiner, *et al.* (2004). "Association of ABCA2 expression with determinants of Alzheimer's disease." *Faseb J* **18**(10): 1129-31.
- Damiani, D., M. Tiribelli, D. Raspadori, A. Michelutti, A. Gozzetti, E. Calistri, *et al.* (2007). "The role of MDR-related proteins in the prognosis of adult acute myeloid leukaemia (AML) with normal karyotype." *Hematol Oncol*.
- Duan, Z., D. E. Lamendola, R. Z. Yusuf, R. T. Penson, F. I. Preffer and M. V. Seiden (2002). "Overexpression of human phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) induces a multidrug resistance phenotype." *Anticancer Res* **22**(4): 1933-41.
- Efferth, T., J. P. Gillet, A. Sauerbrey, F. Zintl, V. Bertholet, F. de Longueville, *et al.* (2006). "Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Mol Cancer Ther* **5**(8): 1986-94.
- Fenaux, P., C. Chomienne and L. Degos (2001). "All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia." *Semin Hematol* **38**(1): 13-25.
- Filipits, M., T. Stranzl, G. Pohl, R. W. Suchomel, S. Zochbauer, R. Brunner, *et al.* (1999). "MRP expression in acute myeloid leukemia. An update." *Adv Exp Med Biol* **457**: 141-50.
- Filipits, M., R. W. Suchomel, S. Zochbauer, R. Brunner, K. Lechner and R. Pirker (1997). "Multidrug resistance-associated protein in acute myeloid leukemia: No impact on treatment outcome." *Clin Cancer Res* **3**(8): 1419-25.
- Furuya, K. N., G. Bradley, D. Sun, E. G. Schuetz and J. D. Schuetz (1997). "Identification of a new P-glycoprotein-like ATP-binding cassette transporter gene that is overexpressed during hepatocarcinogenesis." *Cancer Res* **57**(17): 3708-16.
- Galimberti, S., R. Testi, F. Guerrini, R. Fazzi and M. Petrini (2003). "The clinical relevance of the expression of several multidrug-resistant-related genes in patients with primary acute myeloid leukemia." *J Chemother* **15**(4): 374-9.
- Guerrasio, A., C. Pilatrinio, D. De Micheli, D. Cilloni, A. Serra, E. Gottardi, *et al.* (2002). "Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts." *Leukemia* **16**(6): 1176-81.
- Hait, W. N., S. Choudhury, S. Srimatkandada and J. R. Murren (1993). "Sensitivity of K562 human chronic myelogenous leukemia blast cells transfected with a human multidrug resistance cDNA to cytotoxic drugs and differentiating agents." *J Clin Invest* **91**(5): 2207-15.
- Hart, S. M., K. Ganeshaguru, A. V. Hoffbrand, H. G. Prentice and A. B. Mehta (1994). "Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute leukaemia." *Leukemia* **8**(12): 2163-8.
- Huh, H. J., J. W. Huh, E. S. Yoo, C. M. Seong, M. Lee, K. S. Hong, *et al.* (2005). "hTERT mRNA levels by real-time RT-PCR in acute myelogenous leukemia." *Am J Hematol* **79**(4): 267-73.
- Kaminski, W. E., A. Piehler, K. Pullmann, M. Porsch-Ozcurumez, C. Duong, G. M. Bared, *et al.* (2001). "Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2

- gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 249-58.
- Kondo, M., K. Kudo, H. Kimura, J. Inaba, K. Kato, S. Kojima, *et al.* (2000). "Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of AML1-MTG8 fusion transcripts in t(8;21)-positive acute myelogenous leukemia." Leuk Res **24**(11): 951-6.
- Kosugi, H., M. Towatari, S. Hatano, K. Kitamura, H. Kiyoi, T. Kinoshita, *et al.* (1999). "Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy." Leukemia **13**(9): 1316-24.
- Krauter, J., M. P. Wattjes, S. Nagel, O. Heidenreich, U. Krug, S. Kafert, *et al.* (1999). "Real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21)-positive AML patients." Br J Haematol **107**(1): 80-5.
- Krishnamurthy, P. C., G. Du, Y. Fukuda, D. Sun, J. Sampath, K. E. Mercer, *et al.* (2006). "Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter." Nature **443**(7111): 586-9.
- Laing, N. M., M. G. Belinsky, G. D. Kruh, D. W. Bell, J. T. Boyd, L. Barone, *et al.* (1998). "Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells." Cancer Res **58**(7): 1332-7.
- Le Moyec, L., O. Legrand, V. Larue, M. Kawakami, J. P. Marie, F. Calvo, *et al.* (2000). "Magnetic resonance spectroscopy of cellular lipid extracts from sensitive, resistant and reverting K562 cells and flow cytometry for investigating the P-glycoprotein function in resistance reversion." NMR Biomed **13**(2): 92-101.
- Legrand, O., G. Simonin, A. Beauchamp-Nicoud, R. Zittoun and J. P. Marie (1999). "Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia." Blood **94**(3): 1046-56.
- Leith, C. P., K. J. Kopecky, I. M. Chen, L. Eijdem, M. L. Slovak, T. S. McConnell, *et al.* (1999). "Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study." Blood **94**(3): 1086-99.
- Leith, C. P., K. J. Kopecky, J. Godwin, T. McConnell, M. L. Slovak, I. M. Chen, *et al.* (1997). "Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study." Blood **89**(9): 3323-9.
- Liu, K., K. A. Kreuzer, U. Lass and C. A. Schmidt (2005). "Assessment of chemosensitivity by monitoring bcl-2 transcript kinetics in acute myeloid leukemias." Hematol Oncol **23**(2): 68-72.
- Lorico, A., G. Rappa, R. A. Flavell and A. C. Sartorelli (1996). "Double knockout of the MRP gene leads to increased drug sensitivity in vitro." Cancer Res **56**(23): 5351-5.
- Lowenberg, B. (2001). "Prognostic factors in acute myeloid leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **14**(1): 65-75.
- Lowenberg, B., J. R. Downing and A. Burnett (1999). "Acute myeloid leukemia." N Engl J Med **341**(14): 1051-62.
- Luker, G. D., C. M. Pica, A. S. Kumar, D. F. Covey and D. Piwnicka-Worms (2000). "Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains." Biochemistry **39**(29): 8692.
- Mace, S., E. Cousin, S. Ricard, E. Genin, E. Spanakis, C. Lafargue-Soubigou, *et al.* (2005). "ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease." Neurobiol Dis **18**(1): 119-25.
- Malagola, M., D. Damiani, G. Martinelli, A. Michelutti, B. Cesana, A. D. Vivo, *et al.* (2007). "Case-control study of multidrug resistance phenotype and response to induction treatment including or not fludarabine in newly diagnosed acute myeloid leukaemia patients." Br J Haematol **136**(1): 87-95.
- Mitsuhashi, N., T. Miki, H. Senbongi, N. Yokoi, H. Yano, M. Miyazaki, *et al.* (2000). "MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis." J Biol Chem **275**(23): 17536-40.
- Nishimura, M., H. Yoshitsugu, S. Naito and I. Hiraoka (2002). "Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR." Yakugaku Zasshi **122**(5): 339-61.

- Ohtsuki, S., Y. Watanabe, S. Hori, H. Suzuki, J. Bhongsatiern, M. Fujiyoshi, *et al.* (2004). "mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells." *Biol Pharm Bull* **27**(9): 1437-40.
- Pallares-Trujillo, J., F. J. Lopez-Soriano and J. M. Argiles (2000). "Lipids: A key role in multidrug resistance? (Review)." *Int J Oncol* **16**(4): 783-98.
- Park, S., C. Shimizu, T. Shimoyama, M. Takeda, M. Ando, T. Kohno, *et al.* (2006). "Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* **99**(1): 9-17.
- Ross, D. D. (2000). "Novel mechanisms of drug resistance in leukemia." *Leukemia* **14**(3): 467-73.
- Ross, D. D. (2004). "Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome." *Best Pract Res Clin Haematol* **17**(4): 641-51.
- Ross, D. D., J. E. Karp, T. T. Chen and L. A. Doyle (2000). "Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia." *Blood* **96**(1): 365-8.
- Rothnie, A., D. Theron, L. Soceneantu, C. Martin, M. Traikia, G. Berridge, *et al.* (2001). "The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence." *Eur Biophys J* **30**(6): 430-42.
- Sarkar, M., T. Han, V. Damaraju, P. Carpenter, C. E. Cass and R. P. Agarwal (2005). "Cytosine arabinoside affects multiple cellular factors and induces drug resistance in human lymphoid cells." *Biochem Pharmacol* **70**(3): 426-32.
- Saussoy, P., J. L. Vaerman, N. Straetmans, V. Deneys, G. Cornu, A. Ferrant, *et al.* (2004). "Differentiation of acute myeloid leukemia from B- and T-lineage acute lymphoid leukemias by real-time quantitative reverse transcription-PCR of lineage marker mRNAs." *Clin Chem* **50**(7): 1165-73.
- Schmitz, G., T. Langmann and S. Heimerl (2001). "Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism." *J Lipid Res* **42**(10): 1513-20.
- Schneider, E., K. H. Cowan, H. Bader, S. Toomey, G. N. Schwartz, J. E. Karp, *et al.* (1995). "Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia." *Blood* **85**(1): 186-93.
- Scholl, C., H. Breitinger, R. F. Schlenk, H. Dohner, S. Frohling and K. Dohner (2003). "Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22;q23) in acute myeloid leukemia." *Genes Chromosomes Cancer* **38**(3): 274-80.
- Stam, R. W., M. M. van den Heuvel-Eibrink, M. L. den Boer, M. E. Ebus, G. E. Janka-Schaub, J. D. Allen, *et al.* (2004). "Multidrug resistance genes in infant acute lymphoblastic leukemia: Ara-C is not a substrate for the breast cancer resistance protein." *Leukemia* **18**(1): 78-83.
- Steinbach, D., J. P. Gillet, A. Sauerbrey, B. Gruhn, K. Dawczynski, V. Bertholet, *et al.* (2006). "ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia." *Clin Cancer Res* **12**(14 Pt 1): 4357-63.
- Steinbach, D., W. Sell, A. Voigt, J. Hermann, F. Zintl and A. Sauerbrey (2002). "BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia." *Leukemia* **16**(8): 1443-7.
- Sugahara, K., A. Uemura, H. Harasawa, H. Nagai, Y. Hirakata, M. Tomonaga, *et al.* (2004). "Clinical relevance of survivin as a biomarker in neoplasms, especially in adult T-cell leukemias and acute leukemias." *Int J Hematol* **80**(1): 52-8.
- Troost, J., H. Lindenmaier, W. E. Haefeli and J. Weiss (2004). "Modulation of cellular cholesterol alters P-glycoprotein activity in multidrug-resistant cells." *Mol Pharmacol* **66**(5): 1332-9.
- van den Heuvel-Eibrink, M. M., B. van der Holt, A. K. Burnett, W. U. Knauf, M. F. Fey, G. E. Verhoef, *et al.* (2007). "CD34-related coexpression of MDR1 and BCRP indicates a clinically resistant phenotype in patients with acute myeloid leukemia (AML) of older age." *Ann Hematol* **86**(5): 329-37.
- van den Heuvel-Eibrink, M. M., B. van der Holt, P. A. te Boekhorst, R. Pieters, M. Schoester, B. Lowenberg, *et al.* (1997). "MDR 1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in de novo acute myeloid leukaemia." *Br J Haematol* **99**(1): 76-83.
- van den Heuvel-Eibrink, M. M., E. A. Wiemer, A. Prins, J. P. Meijerink, P. J. Vossebeld, B. van der Holt, *et al.* (2002). "Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML)." *Leukemia* **16**(5): 833-9.

- van der Pol, M. A., H. J. Broxterman, J. M. Pater, N. Feller, M. van der Maas, G. W. Weijers, *et al.* (2003). "Function of the ABC transporters, P-glycoprotein, multidrug resistance protein and breast cancer resistance protein, in minimal residual disease in acute myeloid leukemia." Haematologica **88**(2): 134-47.
- Wilson, C. S., G. S. Davidson, S. B. Martin, E. Andries, J. Potter, R. Harvey, *et al.* (2006). "Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction." Blood **108**(2): 685-96.
- Wuchter, C., K. Leonid, V. Ruppert, M. Schrappe, T. Buchner, C. Schoch, *et al.* (2000). "Clinical significance of P-glycoprotein expression and function for response to induction chemotherapy, relapse rate and overall survival in acute leukemia." Haematologica **85**(7): 711-21.
- Yabuuchi, H., S. Takayanagi, K. Yoshinaga, N. Taniguchi, H. Aburatani and T. Ishikawa (2002). "ABCC13, an unusual truncated ABC transporter, is highly expressed in fetal human liver." Biochem Biophys Res Commun **299**(3): 410-7.
- Yasui, K., S. Mihara, C. Zhao, H. Okamoto, F. Saito-Ohara, A. Tomida, *et al.* (2004). "Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance." Cancer Res **64**(4): 1403-10.
- Zenhäusern, R., C. Zwicky, M. Solenthaler, M. F. Fey and A. Tobler (2003). "Leucémies aiguës de l'adulte." Forum Med Suisse(29/30): 684-92.
- Zhou, D. C., R. Zittoun and J. P. Marie (1995). "Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) and multidrug resistance (MDR1) genes in acute myeloid leukemia." Leukemia **9**(10): 1661-6.

Chapitre VII

Profil d'expression des transporteurs ABC dans des lignées cellulaires sensibles et résistantes

Chapitre VII : Profil d'expression des transporteurs ABC dans des lignées cellulaires sensibles et résistantes

I INTRODUCTION

1 La cellule cancéreuse

Les cellules cancéreuses sont des cellules qui vont perdre au cours des divisions successives les capacités de régulation inhérentes à toutes les cellules normales de l'organisme. La cellule cancéreuse devient immortelle ; elle se multiplie indéfiniment sans se différencier et donne une lignée cancéreuse appelée clone. Elle échappe aux contraintes auxquelles sont soumises les cellules saines, se multiplie de façon permanente, anarchique, et s'entasse en désordre sans respect pour la trame du tissu d'origine. Bien que l'origine monoclonale d'une tumeur maligne soit couramment admise, l'instabilité génétique des cellules cancéreuses est à l'origine d'une hétérogénéité tumorale phénotypique et génotypique (morphologie, marqueurs de surface, caryotype, immunogénicité, capacité proliférative et métastatique, sensibilité aux traitements...). Des mutations successives favorisent le développement d'un nouveau clone plus malin qui va dominer les autres clones et rendre la tumeur plus invasive.

Quand la tumeur atteint quelques mm³, les cellules cancéreuses doivent, pour survivre, développer tout un système sanguin nourricier à partir des structures vasculaires existantes : c'est le phénomène d'angiogenèse. L'angiogenèse entretient le développement de la tumeur initiale et permet la dissémination métastatique des cellules (Bikfalvi 2003).

Mécanismes biologiques

La genèse d'un cancer comprend schématiquement trois étapes :

- **l'initiation**, qui s'identifie à une lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un carcinogène
- **la promotion**, qui correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue à une substance entretenant et stabilisant la lésion
- **la progression**, qui correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, d'indépendance, de perte de la différenciation, d'invasion (locale et métastatique).

Suite à la cancérogenèse, la tumeur va ensuite évoluer, proliférer de façon incontrôlée, et envahir progressivement les tissus voisins en formant des métastases au sein de l'organisme (Tableau 17).

Etapes	Mécanismes possibles
1. Initiation tumorale	Atteinte par un carcinogène Activation ou dérégulation d'un oncogène Réarrangement chromosomique
2. Promotion 3. Progression	Instabilité génétique Amplification des gènes Perte ou mutation de gènes suppresseurs
4. Prolifération incontrôlée	Synthèse autocrine de facteurs de croissance Mauvaise régulation des récepteurs altérés Transmission anarchique du signal
5. Angiogenèse	Fabrication de facteurs de croissance angiogènes
6. Invasion locale	Facteurs chimiotactiques Facteurs autocrines de motricité Récepteurs d'adhésion Augmentation de l'activité des enzymes lytiques Perte d'expression des inhibiteurs des protéases
7. Circulation des cellules tumorales	Agrégation des cellules tumorales Interaction avec fibrine, plaquettes, et arrêt dans les microvaisseaux facteurs de coagulation Interaction avec les récepteurs laminine et collagène Enzymes lytiques
8. Formation de colonies	Récepteurs de facteurs de croissance Facteurs angiogéniques métastatiques Mutation ou perte de gènes suppresseurs de métastase
9. Evasion des défenses de l'organisme	Résistance aux cellules destructrices (Natural killer, lymphocytes activés)
10. Résistance au traitement	Acquisition de la résistance aux drogues (gènes spécifiques)

Tableau 17 : Etapes de la cancérogenèse.

2 Un traitement anticancéreux : La chimiothérapie

Il existe différents traitements : chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie. Ces traitements sont utilisés seuls ou, le plus souvent en association. Parmi ces traitements, la chimiothérapie occupe une place centrale. Elle a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses et d'éviter les rechutes locales et les métastases.

La chimiothérapie anticancéreuse consiste en l'utilisation de médicaments interférant dans le métabolisme et la vie cellulaire et qui, de ce fait, sont cytotoxiques : c'est par ce mécanisme que la chimiothérapie permet d'inhiber la croissance tumorale.

2.1 Historique de la chimiothérapie anticancéreuse

Alors que la description des cancers remonte à la plus haute antiquité, les premières tentatives de traitement médical des tumeurs malignes datent d'un peu plus de 500 ans avec des préparations les plus diverses d'argent, zinc et mercure.

Le premier traitement systémique du cancer date de 1865 lorsque le médecin allemand Lissauer observe pour la première fois l'effet antitumoral de l'arsénite de potassium sur un patient atteint d'une leucémie. Mais ce n'est que 80 ans plus tard que naît véritablement la pharmacologie antitumorale. En 1943, un effet leucopéniant fut constaté chez des marins américains exposés par accident à du gaz moutarde. Des recherches entreprises sur ce sujet ont ensuite abouti aux premiers essais de traitement d'affections hématologiques par la moutarde azotée. L'avènement de la chimiothérapie dans les années 1950-1960 a considérablement modifié l'évolution clinique d'un certain nombre de néoplasies. Ensuite, on a observé de véritables guérisons de certaines tumeurs solides, de lymphomes et de leucémies. Des régressions spectaculaires ont pu contribuer à l'amélioration des stratégies thérapeutiques combinant les trois grandes modalités que sont la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux. Depuis, des milliers de nouvelles molécules ont été élaborées et testées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Seulement quelques unes sont utilisées en clinique.

L'obstacle majeur de ces traitements tient à la toxicité des antimétabolites sur les tissus sains et à leurs effets sur le matériel génétique, sources de mutations et de phénomènes de résistance parfois très rapidement acquis.

2.2 La réponse aux chimiothérapies anticancéreuses

Cliniquement, on peut distinguer trois types de tumeurs en fonction de leur réponse à la chimiothérapie :

- celles pour lesquelles on obtient une réponse rapide et complète par la chimiothérapie. Ces tumeurs sont dites sensibles.

- celles qui sont, au départ, très sensibles à la chimiothérapie, mais qui progressivement deviennent résistantes. On parle alors de résistance acquise.

- celles qui, d'emblée, sont peu sensibles à la chimiothérapie. Dans ce cas on parle de résistance intrinsèque.

2.3 Le phénomène de chimiorésistance

La chimiothérapie occupe désormais une place centrale dans le traitement des cancers puisqu'elle a pour objet non seulement de réduire le volume de la masse tumorale primaire, mais aussi d'éliminer la maladie circulante et métastatique. Cependant, en dépit du développement des traitements, toutes les tumeurs ne sont pas curables par la seule chimiothérapie. Dans certains cas, une résistance multiple peut s'établir vis à vis de différents agents anticancéreux. Dans son expression clinique, la chimiorésistance peut se définir comme la capacité des cellules cancéreuses à survivre à l'exposition d'agents cytotoxiques lorsqu'ils sont administrés à la dose maximale tolérable pour les tissus normaux. Ces cellules devenues insensibles au traitement peuvent reconstituer rapidement d'autres foyers cancéreux.

Ce phénomène appelé multirésistance aux drogues a été mis en évidence par Biedler et Riehm, en 1970, dans des lignées tumorales : ils ont observé qu'en rendant ces cellules résistantes à un cytostatique (l'actinomycine D), celles-ci devenaient simultanément résistantes à d'autres cytostatiques de mode d'action et de structure totalement différents (Biedler and Riehm 1970). Cette résistance croisée, retrouvée depuis dans beaucoup de lignées tumorales d'espèce et d'origine tissulaire différentes, s'observe vis-à-vis de nombreux cytotoxiques. Depuis la découverte des premières substances anticancéreuses, de nombreux travaux de recherche ont eu pour but l'identification des mécanismes responsables de cette chimiorésistance. C'est à partir de cultures cellulaires *in vitro*, cultivées en présence d'anticancéreux que les biologistes ont identifié des mécanismes de résistance cellulaire et envisagé des stratégies pour lutter contre ces mécanismes (Benard and Rixe 1996). Historiquement, le premier mécanisme identifié est l'hyperproduction de la dihydrofolate réductase. Cependant d'autres mécanismes ont été découverts par la suite, notamment la surexpression de protéines de transport permettant d'empêcher l'accumulation intracellulaire de certaines drogues grâce à un efflux actif des cytostatiques. Plusieurs molécules appartenant à la famille des transporteurs ABC peuvent être à l'origine de cet efflux.

La première des protéines ABC décrite dans le modèle de résistance est ABCB1 (MDR1, P-glycoprotéine, MultiDrug Resistance protein) (Juliano and Ling 1976) qui appartient à la famille des transporteurs ABC. D'autres protéines ABC ont été décrites pour jouer un rôle dans la multirésistance aux drogues ; il s'agit de ABCC1 (MRP1, Multidrug Resistance associated Protein) (Cole *et al.* 1992) et ABCG2 (BCRP, Breast Cancer Resistance Protein) (Doyle *et al.* 1998). D'autres transporteurs essentiellement de la sous famille C ont aussi été plus récemment associés à des phénotypes de résistance comme ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5 (Gillet *et al.* 2007).

2.4 Un modèle d'étude de chimiorésistance : les lignées cellulaires résistantes

De nombreuses cellules tumorales humaines sont disponibles et couramment utilisées comme modèles expérimentaux dans la recherche sur le cancer. Ces cellules humaines servent généralement d'outil permettant de comprendre le comportement de certaines tumeurs et sont utilisées en routine pour tester de nouvelles molécules cytotoxiques.

Parmi ces lignées cellulaires, certaines sont sélectionnées par des cytotoxiques utilisés en chimiothérapie et acquièrent une résistance pour ces cytotoxiques. Ces cellules résistantes sont des outils permettant d'étudier le phénomène de chimiorésistance, et sont utilisées pour sélectionner des inhibiteurs de ce phénomène de résistance.

Généralement, ces cellules rendues résistantes à un cytotoxique sont connues pour surexprimer un transporteur ABC qui serait responsable de cette résistance. Cependant, le pattern d'expression en transporteur ABC de ces lignées cellulaires reste mal connu. Etant donné les similarités de structure et de fonctions que partagent les membres de cette famille, d'autres transporteurs ABC pourraient être impliqués dans cette résistance.

II RESULTATS

1 Lignées cellulaires testées

Nous avons testé l'expression de l'ensemble des transporteurs ABC sur huit lignées cellulaires. Ces lignées cellulaires sont classiquement utilisées pour des essais de cytotoxicité.

Les lignées cellulaires ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr. Jean-Pierre Marie (Hôtel Dieu, Paris). Nous disposons de trois types de lignées cellulaires une lignée myéloïde aiguë (HL60), une lignée myéloïde chronique (K562) et une lignée d'adénocarcinome mammaire (MCF7). Pour ces lignées nous disposons de la

lignée dite sensible et des lignées dont la résistance avait été induite par différents cytotoxiques. Ces lignées résistantes ont été obtenues par culture des lignées sensibles pendant plusieurs mois en présence de concentrations croissantes de cytotoxique, jusqu'aux valeurs indiquées (Tableau 18).

Type cellulaire	Désignation	Résistance
HL60	HL60S	-
	HL60MDR	Daunorubicine (10^{-6} M)
	HL60MRP	Doxorubicine (10^{-6} M)
K562	K562S	-
	K562HHT40	Homoharringtonine (40ng/ml)
	K562R	Doxorubicine (10^{-6} M)
MCF7	MCF7S	-
	MCF7R	Doxorubicine (10^{-6} M)

Tableau 18 : différentes lignées cellulaires testées

La daunorubicine et la doxorubicine font partie de la famille des anthracyclines, qui forment une famille de cytotoxiques antitumoraux initialement isolés à partir de *Streptomyces*. Leurs mécanismes d'action sont multiples : outre l'intercalation dans l'ADN, les anthracyclines aboutissent à la formation de radicaux libres, ce qui explique en partie leur toxicité cardiaque. Les anthracyclines agissent essentiellement en rendant impossible la dissociation de l'ADN des topoisomérases II. Ces enzymes contrôlent la topologie de l'ADN en coupant de manière transitoire les deux brins de l'ADN. Ils sont impliqués dans les processus de réparation, de réplication, de transcription et de ségrégation des chromosomes durant la mitose. Après intercalation par une anthracycline, la topoisomérase II tente de corriger la modification de l'enroulement de l'ADN mais le blocage de l'enzyme conduit à une désorganisation structurale de l'ADN et à la mort cellulaire.

La doxorubicine (ou adriamycine) possède une toxicité surtout myocardique. La doxorubicine est largement utilisée au cours des traitements du cancer du sein, des lymphomes, des sarcomes, des tumeurs de l'enfant et des bronches. Deux formes encapsulées dans des liposomes sont utilisées dans les rechutes de cancer de l'ovaire, ou le cancer du sein métastatique.

La daunorubicine a une structure voisine. Sa toxicité hématologique la fait réserver au traitement des leucémies aiguës. Elle existe également sous forme liposomale, la protégeant de toute dégradation et permettant une meilleure sélectivité pour les tissus tumoraux.

L'homoharringtonine (HHT) est un alcaloïde cytotoxique isolé de l'arbre *cephalotaxus harringtonia* originaire des provinces du sud de la Chine. Le mécanisme principal d'action de l'HHT est l'inhibition de la synthèse protéique, en agissant au niveau du ribosome de la cellule cancéreuse. Il bloque le passage des cellules de la phase G1 à la phase S, et de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire. Des essais cliniques ont montré l'efficacité de l'HHT dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM), des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et des syndromes myélodysplasiques (SMD). En revanche, il ne semble pas efficace dans les

leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ni dans les tumeurs solides. Les facteurs toxiques limitant l'administration de l'HHT sont l'hypotension et la myélosuppression. Sa toxicité extramédullaire est relativement faible ; de plus, il n'a pas de toxicité cardiaque comme les anthracyclines, ce qui pourrait être un avantage pour le traitement des patients âgés. Les études pharmacologiques indiquent que l'HHT appartient à la catégorie des anticancéreux influencés par le phénotype de résistance multiple aux anticancéreux (MDR). Les cellules résistantes à l'HHT ont une résistance croisée aux anthracyclines, aux alcaloïdes de pervenche et à la mitoxantrone, mais pas au cisplatine ni à la cytosine-arabine. De multiples mécanismes, incluant l'apparition séquentielle d'une surexpression des gènes MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) et MDR1, est impliquée dans cette résistance croisée à l'HHT dans les cellules tumorales.

2 Choix des gènes de référence

Nous avons choisi des gènes de référence impliqués dans différentes voies métaboliques : la beta2-microglobuline (B2M) ; la Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase (GAPDH) ; Abelson (ABL) ; la beta-glucuronidase (GUSB) ; le cadre ouvert de lecture 33 du chromosome 1 (C1orf33) ; le récepteur de la transferrine (TFRC) ; Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) ; la protéine de migration cellulaire associée à l'angiogenèse (AAMP) ; l'hypoxanthine-phosphoribosyltransferase (HPRT), la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP), l'ARN ribosomal 18S (18S), et la cyclophiline A (PPIA).

Après avoir exporté les valeurs de Ct des 12 gènes de référence, le delta Ct ($Ct - Ct_{max}$) a été analysé grâce au logiciel GeNorm. Nous avons obtenu les résultats de variations par paire nous indiquant que l'utilisation de la moyenne géométrique des 3 meilleurs gènes de référence est satisfaisante pour la normalisation de ces données (Figure 61). Cependant, après avoir observé nos valeurs moyennes de stabilité d'expression, nous avons préféré utiliser les 4 gènes de référence les plus stables pour la normalisation : l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP), l'ARN ribosomal 18S (18S), et la cyclophiline A (PPIA) (Figure 62). Pour chaque lignée cellulaire, nous avons calculé la moyenne géométrique de ces quatre gènes de référence (Ct_{men})

Chaque échantillon a été testé en triplicata sur l'ensemble des transporteurs ABC et douze gènes de référence. Les valeurs de Ct utilisées pour l'analyse des variations d'expression sont donc des moyennes des triplicata.

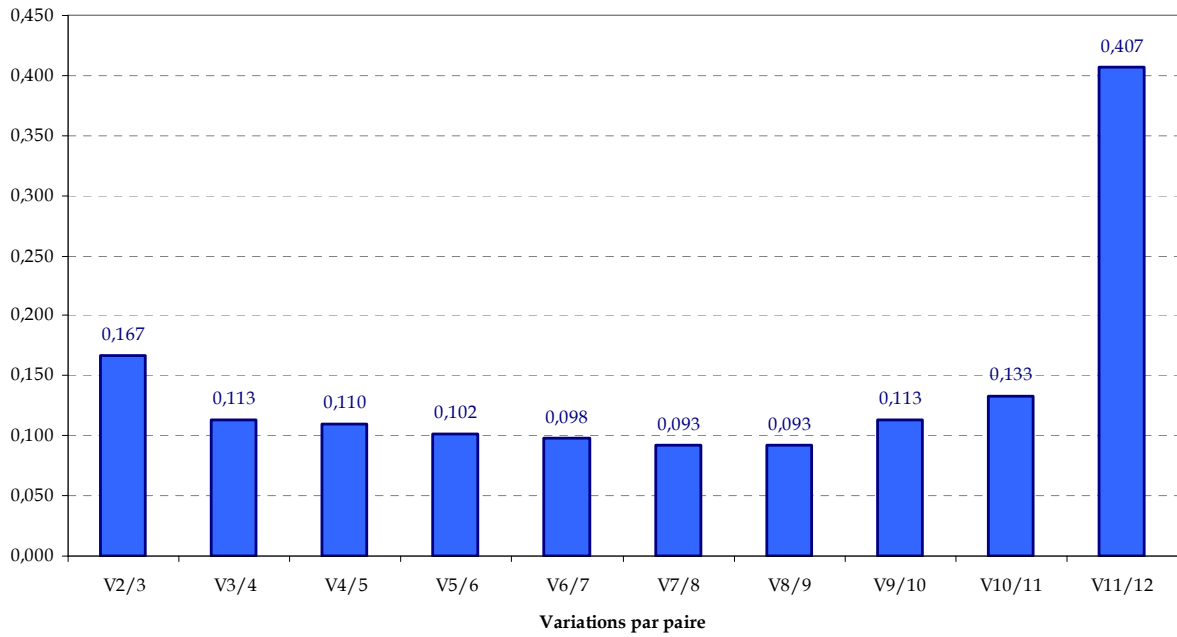


Figure 61 : Détermination du nombre optimal de gènes de référence pour la normalisation.

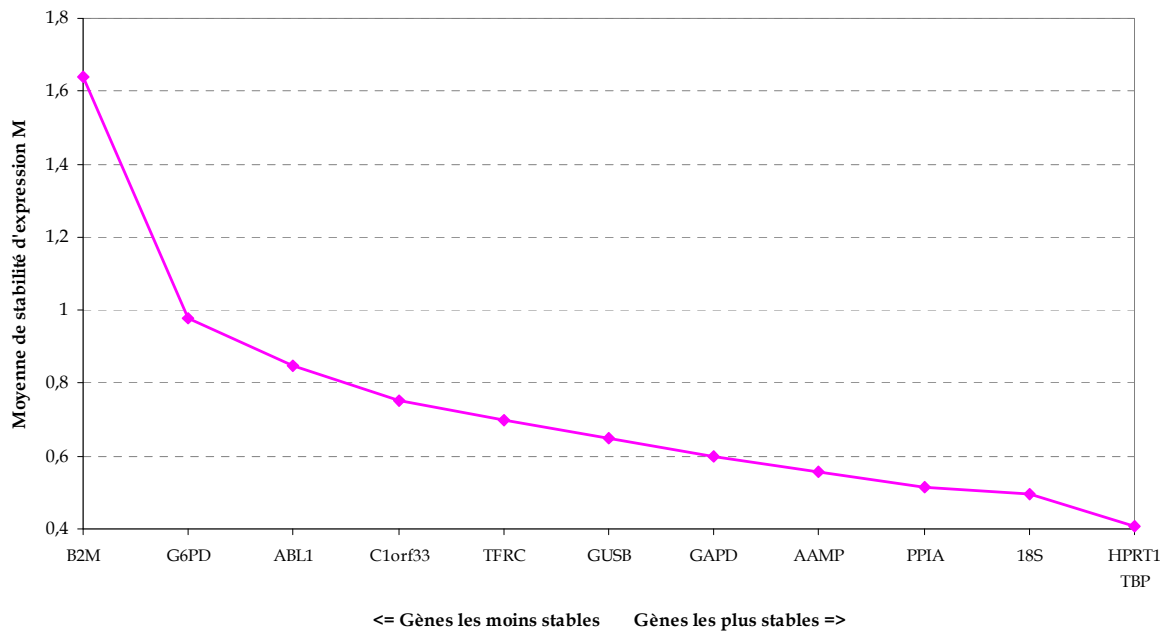


Figure 62 : Moyenne des valeurs de stabilité d'expression des 12 gènes de référence selon GeNorm.

3 Calcul du ratio d'expression RQ

Nous avons calculé les ratios d'expression entre les lignées résistantes et leurs lignées sensibles correspondantes (Figure 63). Les valeurs de Ct comprises entre 35 et 40 n'étant pas assez reproductibles, nous avons fixé le Ct maximum à 35. Nous ne nous sommes intéressés qu'aux variations supérieures ou égales à un facteur deux. Les transcrits sortant avec un Ct supérieur à 30 étant des transcrits très faiblement exprimés, nous n'avons gardé que des variations où au moins un des deux échantillons avait un Ct inférieur à 30. Une fois les données filtrées, les valeurs de quantification relative (RQ) sont calculées entre la population de cellules résistantes et la lignée sensible correspondante en prenant comme référentiel la lignée sensible.

Les lignées dont la résistance est attribuée à ABCB1 (HL60MDR, K562HHT, MCF7R) surexpriment bien ce transporteur. Cependant, les facteurs d'augmentation comparés à ceux de la lignée sensible vont de 85 dans la lignée K562HHT qui a une résistance intermédiaire, en passant par 1 000 pour les K562R, 25 000 pour les MCF7R et jusqu'à 240 000 pour les HL60MDR. Ces facteurs sont à considérer avec prudence, particulièrement pour la lignée HL60MDR où ABCB1 est absent dans la lignée sensible ce qui influence le ratio calculé.

La lignée HL60MRP connue pour surexprimer ABCC1 possède effectivement plus de transcrits d'ABCC1 (15 fois plus dans les résistantes que dans les sensibles). De façon surprenante, le transporteur ABCC1 est également surexprimé dans la lignée MCF7R d'environ 5 fois plus que la lignée sensible et n'a jamais été décrit comme étant surexprimé dans cette lignée.

Ces 2 transporteurs ABC qui ont été décrits pour induire le phénomène de résistance dans ces lignées ne sont cependant pas les seuls à être surexprimés dans les lignées résistantes. Pour ces transporteurs non décrits, nous nous sommes intéressés essentiellement aux facteurs d'augmentation supérieurs à 10.

Dans la lignée HL60MDR, en plus d'ABCB1, l'expression de deux transporteurs augmente de plus de 100 fois : ABCB4 (500 fois) et ABCA9 (180 fois). Dans cette lignée résistante, peu de gènes sont réprimés en comparaison avec la lignée sensible.

Dans la lignée HL60MRP, deux transporteurs ABC autres qu'ABCC1 sont surexprimés d'un facteur 10 environ : ABCA2 et ABCB11. En revanche, l'expression de 3 transporteurs diminue fortement : ABCB9, ABCA6 et ABCB6.

Pour les deux lignées K562 résistantes on observe peu de variations de transporteurs ABC par rapport à la lignée sensible. Pour les K562HHT il n'y a pas de transporteur autre qu'ABCB1, qui ait une variation supérieure à 10 ; et seul ABCG2 voit son expression diminuer d'un facteur 10 environ. Pour la lignée K562R, en plus d'ABCB1, un seul transporteur ABC a une variation d'expression importante par rapport aux K562S : il s'agit d'ABCA8 qui augmente de 10 fois dans la lignée résistante.

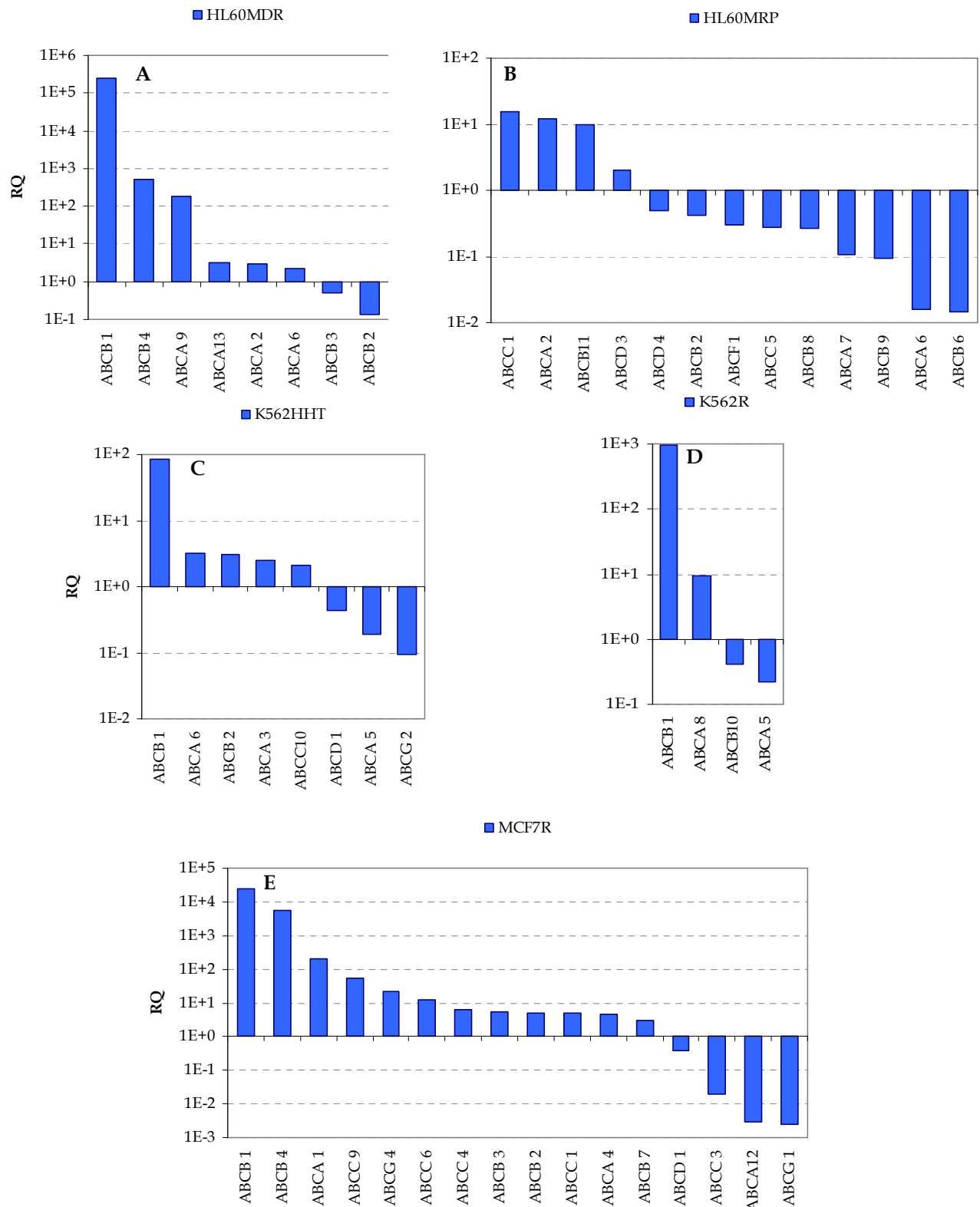


Figure 63 : Facteur de quantification relative de l'expression des transporteurs ABC entre les lignées sensibles et les lignées résistantes

Facteur de quantification calculé pour : A/ la lignée HL60MDR comparé à la lignée HL60S ; B/ HL60MRP comparé à la lignée HL60S ; C/ K562HHT comparé à la lignée K562S ; D/ K562R comparé à la lignée K562S ; E/ MCF7R comparé à la lignée MCF7S.

Enfin, de nombreuses et de fortes différences d'expression sont mesurées entre les lignées MCF7S et MCF7R. Dans la lignée MCF7R, en plus d'ABCB1, 5 transporteurs ont des facteurs d'augmentation supérieurs à 10 comparés à la lignée sensible : ABCB4 (5 300); ABCA1 (200); ABCC9 (50); ABCG4 (23); ABCC6 (10). Trois transporteurs sont réprimés dans les MCF7R : ABCG1 (-400); ABCA12 (-350) et ABCC3 (-50).

ABCB4 connu également sous le nom de MDR2/3 a particulièrement attiré notre attention. En effet l'expression de ce transporteur est fortement augmentée dans deux lignées résistantes surexprimant MDR1 : HL60MDR (RQ=500) et MCF7R (RQ=5400).

4 Cytométrie de flux

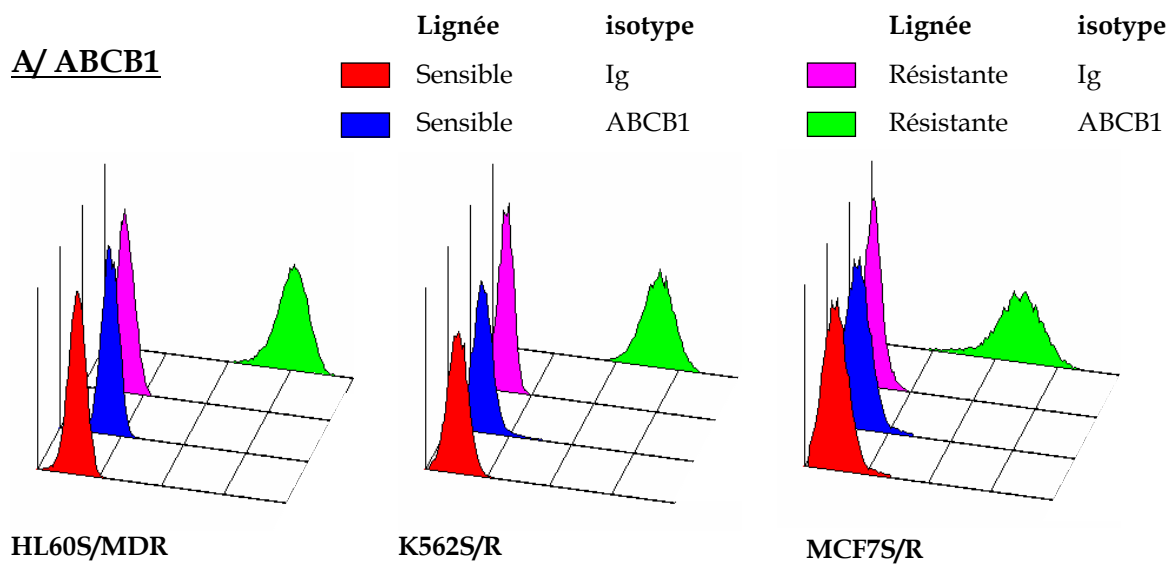
Nous avons vérifié par cytométrie de flux la présence de 4 transporteurs ABC : ABCB1, ABCB4 et ABCC1 pour lesquels on peut voir de fortes variations d'expression dans les lignées résistantes, mais également ABCB2 dont l'expression diminue faiblement dans les HL60MRP (de 3 fois) et les HL60MDR (de 7 fois); et augmente dans les MCF7R (d'un facteur 5) et les K562HHT (de 3 fois). Tous les résultats présentés dans la Figure 64 ont été validés par le test statistique de Kolmogorov-Smirnov.

En ce qui concerne ABCB1, on observe effectivement une forte surexpression de cette protéine dans les HL60MDR, les K562R et les MCF7R en comparaison avec leurs lignées sensibles (Figure 64A).

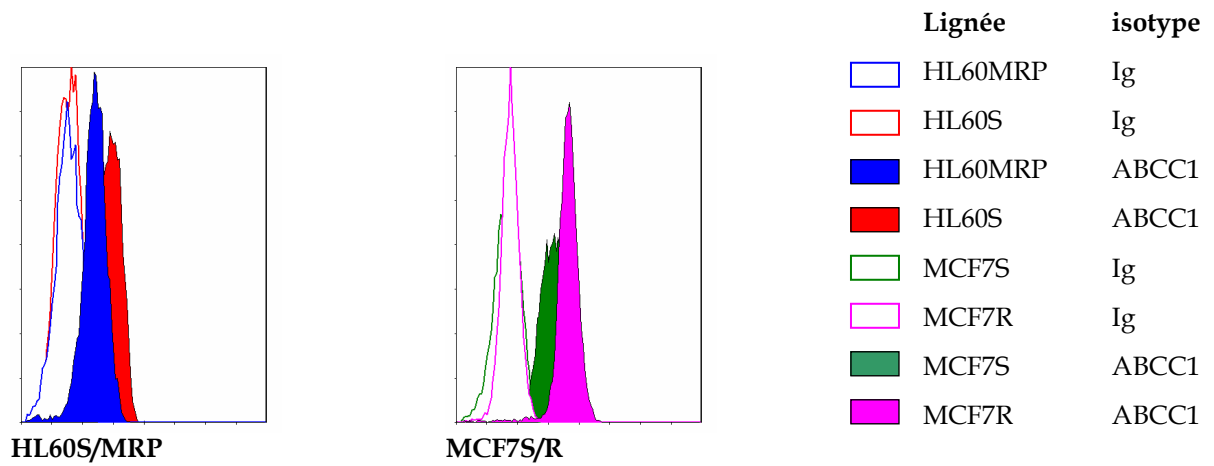
L'analyse en cytométrie de flux de la présence de la protéine ABCB2 confirme que ce transporteur est plus présent dans les cellules HL60S que dans les HL60MRP (Figure 64B gauche); et qu'il est surexprimé dans les cellules MCF7R (Figure 64B droite).

Pour le transporteur ABCC1 nous avons montré que cette protéine était plus exprimée dans la lignée HL60MRP et MCF7R que dans les HL60S et MCF7S respectivement (Figure 64C).

Pour le transporteur ABCB4 nous avons testé deux anticorps différents, cependant nous n'avons pu obtenir de résultats interprétables en cytométrie de flux. Les expériences ont été reproduites par western blot, mais le faible marquage spécifique obtenu ne nous a pas permis de conclure à la présence de cette protéine dans nos échantillons.



B/ ABCB2



C/ ABCC1

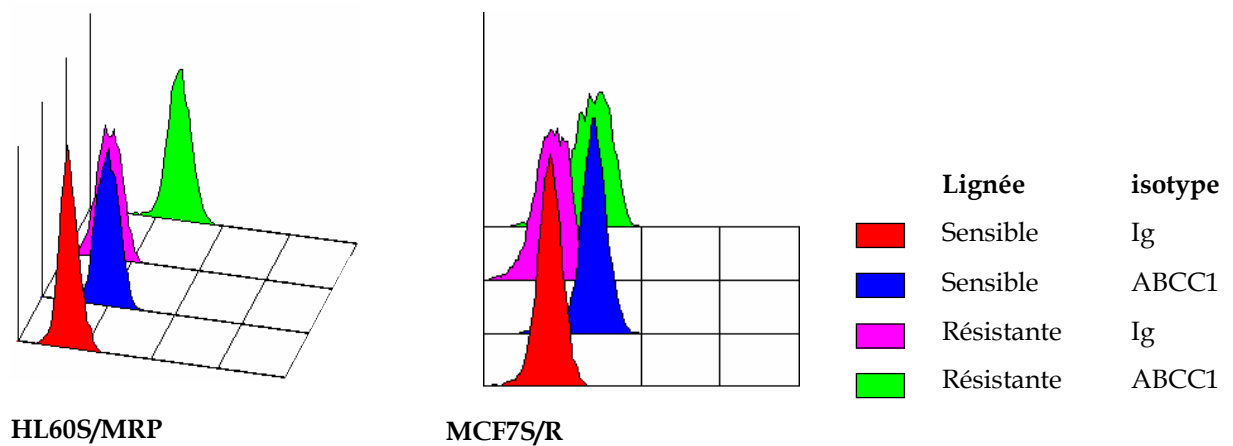


Figure 64 : Cytométrie de flux

Résultats obtenus pour les transporteurs : A/ ABCB1 ; B/ ABCB2 ; C/ ABCC1

5 Quantification du transporteur ABCB4

Comme nous n'arrivions pas à détecter et quantifier la protéine ABCB4 par la technique de cytométrie de flux, nous avons testé 3 sondes TaqMan différentes situées à trois endroits distincts du transcrite d'ABCB4 : une sonde en 5' de la séquence, une sonde en 3' et une sonde vers le milieu de la séquence (Figure 65).

La sonde ABCB4-5' correspond à la sonde TaqMan présente sur nos TLDA.

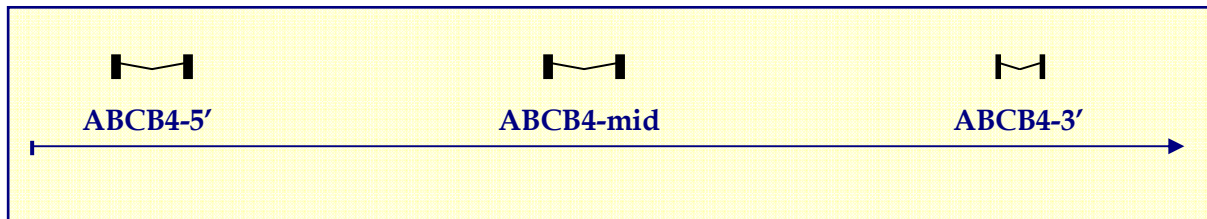


Figure 65 : Position des trois sondes ABCB4 sur le transcrite ABCB4.

Ces trois sondes ont été testées sur les huit lignées sensibles et résistantes. Nous avons comparé les résultats obtenus entre ces trois sondes (Figure 66).

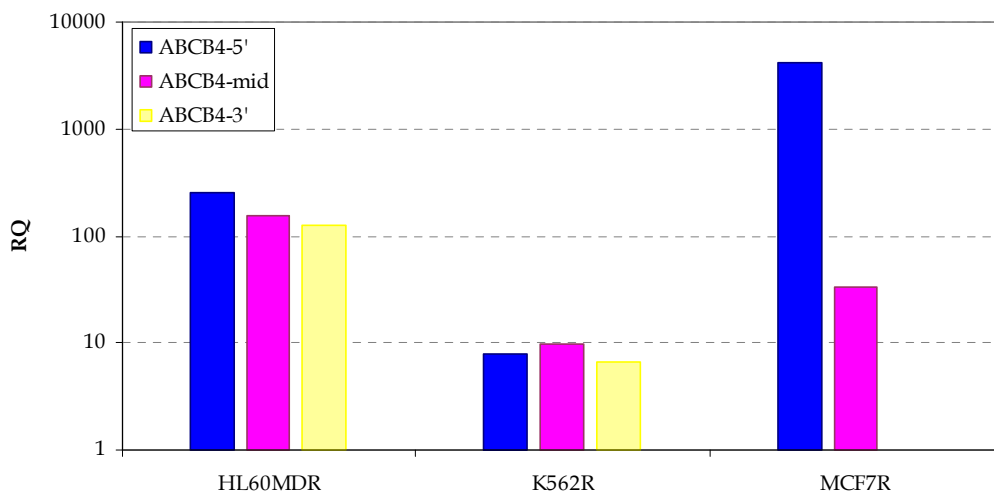


Figure 66 : Facteurs de quantification relative obtenus pour les trois sondes ABCB4 sur trois lignées résistantes comparées à la lignée sensible.

Nous observons pour les trois sondes des facteurs d'augmentation similaires dans les HL60MDR. Pour cette lignée, les Ct obtenus sont aux alentours de 26 ce qui correspond vraisemblablement à des niveaux d'expression moyens. La lignée K562R donne également un RQ proche pour les trois sondes (aux alentours de 8), cependant, les Ct correspondants sont de 32, ce qui signifie que le niveau d'expression est très faible. Dans les MCF7R, pour la sonde ABCB4-5', le RQ est très important 4 300 et le transcrite est bien exprimé (Ct 22). En revanche pour les deux autres sondes. On observe un RQ de 33 pour la sonde ABCB4-mid, et pas d'augmentation pour la sonde située en 3' du transcrite. La variation d'expression que

nous avons observée en TLDA entre les MCF7S et les MCF7R n'est détectée que par la sonde située en 5' du transcrit.

Si l'on regarde la localisation chromosomique des deux gènes ABCB4 et ABCB1, elle est en 7p21.1 pour ces deux gènes (Figure 67). Dans la lignée MCF7R, seul le côté 5' du transcrit ABCB4 est détecté. La quantification du transcrit 5' d'ABCB4 pourrait, dans la lignée MCF7R être due à la surexpression d'ABCB1 qui entraîne vraisemblablement un début de transcription d'ABCB4. Le transcrit ainsi produit est partiel et n'est donc pas détecté par la sonde située en 3'. Le transporteur ABCB4 a déjà été décrit comme surexprimé dans des lignées résistantes dans plusieurs travaux dans lesquels les auteurs ont suggérés son implication dans la résistance (Smith *et al.* 2000; Duan *et al.* 2004; Barraud *et al.* 2005; Johnsson *et al.* 2005). Cependant, Duan et collaborateurs ont montré qu'en transfectant avec des ARN silencieux d'ABCB4 dans leurs lignées résistantes, ils ne reversaient pas leur phénotype résistant.

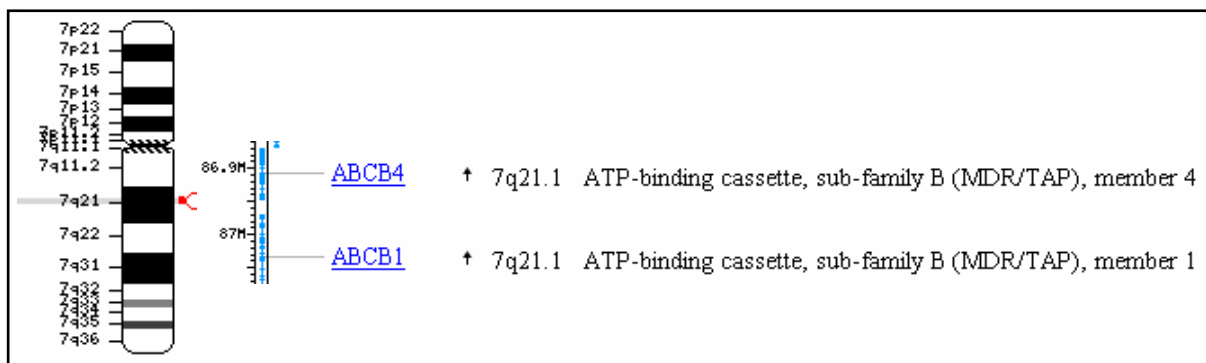


Figure 67 : Position des séquences génomiques d'ABCB1 et ABCB4 sur le chromosome 7.

Ce problème de transcrit incomplet est un cas particulier que nous ne voyons que pour la lignée MCF7R. Ce problème ne se pose pas dans la lignée HL60MDR pour laquelle nous voyons une surexpression d'ABCB4.

6 Estimation du nombre de copies de transcrit par cellule

Pour analyser les valeurs de quantifications relatives, nous avons filtré nos données brutes de PCR en travaillant avec des Ct n'excédant pas 35. Pour avoir une idée du pattern d'expression de l'ensemble des transporteurs ABC nous avons voulu estimer l'abondance de ces transporteurs. Afin de pouvoir comparer les sondes entre elles, nous avons fixé un cycle seuil pouvant convenir à l'ensemble de nos sondes.

6.1 Utilisation d'une gamme étalon

Nous avons utilisé 7 vecteurs d'expression contenant des séquences de transporteurs ABC que nous avons diluées et testées sur nos cartes microfluidiques (voir Chapitre II). Ces gammes de dilutions nous ont permis de déterminer pour chacun des 7 transporteurs ABC testés le Ct correspondant à 1 copie par cupule de PCR. Ce Ct est voisin pour les 7 sondes et la moyenne des 7 Ct nous donne un chiffre proche de 36,9.

Nous avons ainsi déterminé pour un seuil fixé à 0,2, dans nos expériences, qu'une copie de transcrit par cupule de PCR correspond approximativement à un Ct de 36,9 (Tableau 19).

Sonde	Equation de la gamme étalon	Efficacité	Ct pour 1 copie par cupule de PCR
ABCB1	$y=-3,5435x+37,105$	1,91	37,105
ABCB4	$y=-3,4995x+36,339$	1,93	36,339
ABCC1	$y=-3,6316x+37,140$	1,88	37,140
ABCC7	$y=-3,4354x+37,581$	1,95	37,581
ABCF1	$y=-3,5354x+38,191$	1,92	38,191
ABCG1	$y=-3,5181x+36,126$	1,92	36,126
ABCG2	$y=-3,5231x+36,058$	1,92	36,058
Moyenne			≈ 36,9

Tableau 19 : Evaluation du Ct correspondant à une copie par cupule dans nos expériences.

Le calcul du nombre de copies N par cupule de PCR pour un gène x est donc :

$$N=2^{(36,9-Ctx)}$$

Nous avons ensuite voulu estimer le nombre de cellules utilisées pour obtenir l'ARN, puis l'ADNc déposé dans une cupule de PCR. Ceci nous permettra ensuite d'avoir une estimation du nombre de copies par cellule.

Chaque extraction d'ARN a été effectuée avec 5.10^6 cellules. A la fin de chaque extraction d'ARN, nous avons obtenu en moyenne 60µg d'ARN. De ces 60µg d'ARN, après la réaction de rétrotranscription, 1,5ng sont déposés dans chaque cupule de PCR. Si n_{cell} est le nombre de cellules par cupule.

$$n_{cell} = \frac{5.10^6 \times 1,5}{60.10^3} \quad n_{cell} = 125$$

Nous avons donc estimé qu'en moyenne, le nombre de cellules par cupule était de 125. Etant donné que le Ct_{men} est différent entre chaque lignée, nous en avons déduit que nous n'avions pas utilisé exactement le même nombre de cellules par cupule. Nous avons donc corrigé le nombre de cellules par cupule en fonction du Ct_{men} obtenu ce qui nous a donné le nombre de cellules par cupule utilisée dans chaque lignée n_{cor} (Tableau 20). Ces résultats sont assez homogènes au sein de chaque type cellulaire.

Lignée	Nombre de cellules par cupule (n_{cor})
MCF7S	86
MCF7R	101
K562S	106
K562R	123
K562HHT40	135
HL60S	148
HL60MDR	138
HL60MRP	190

Tableau 20 : Estimation du nombre de cellules par cupule dans nos 8 lignées cellulaires.

Les estimations du nombre de copies par cellule sont calculées ainsi :

$$\text{Nb copies/cell} = \frac{N}{n_{\text{cor}}}$$

L'estimation du nombre de copies de transcrit par cellule de chaque lignée résistante et sa lignée sensible sont représentés Figure 68, Figure 69, Figure 70, Figure 71 et Figure 72.

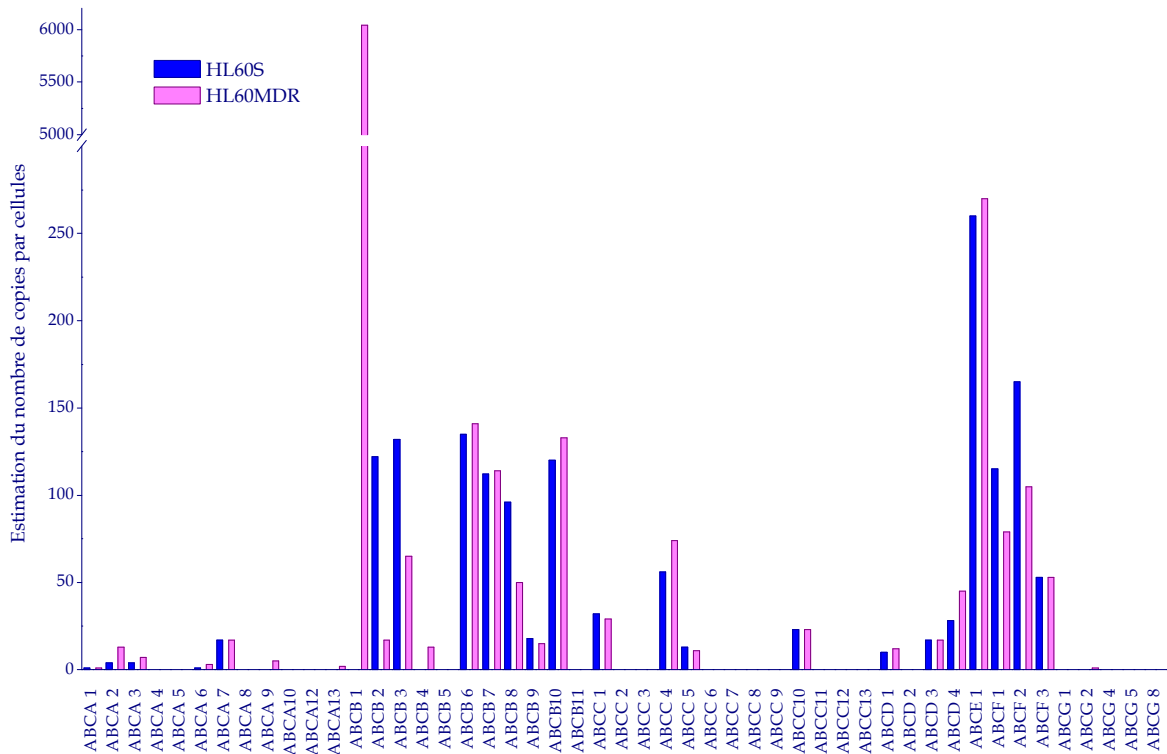


Figure 68 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les HL60S et les HL60MDR.

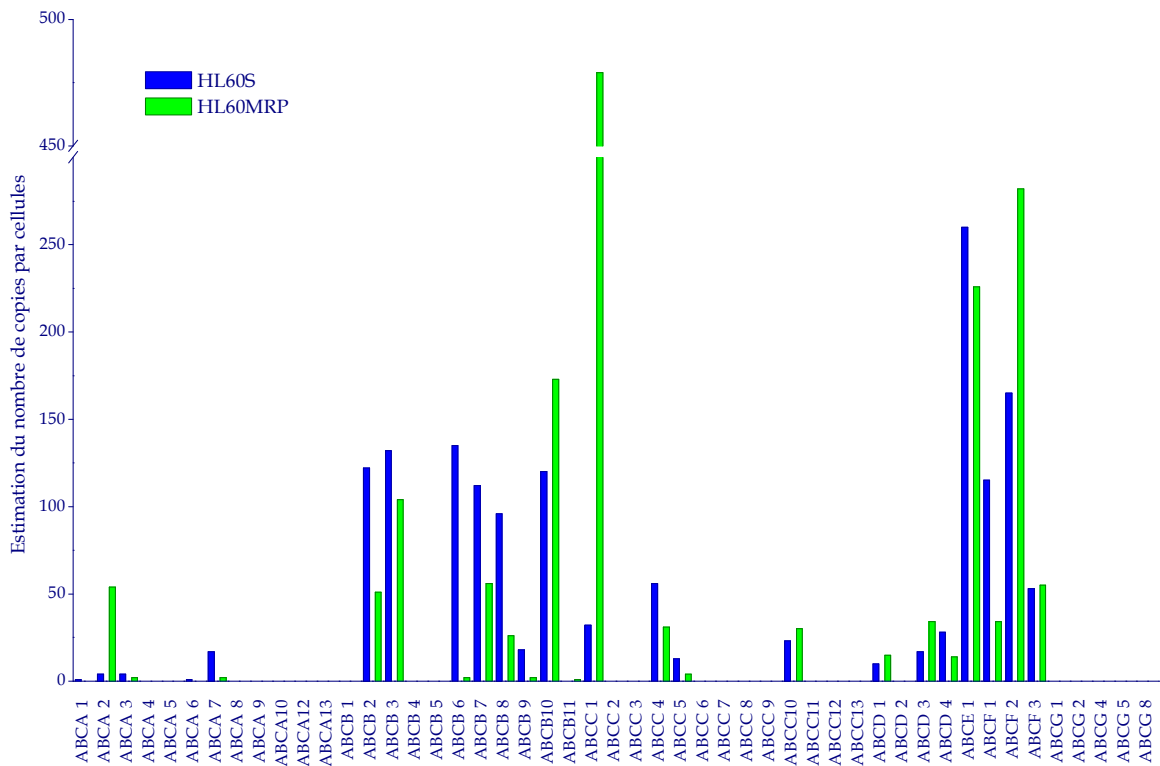


Figure 69 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les HL60S et les HL60MRP.

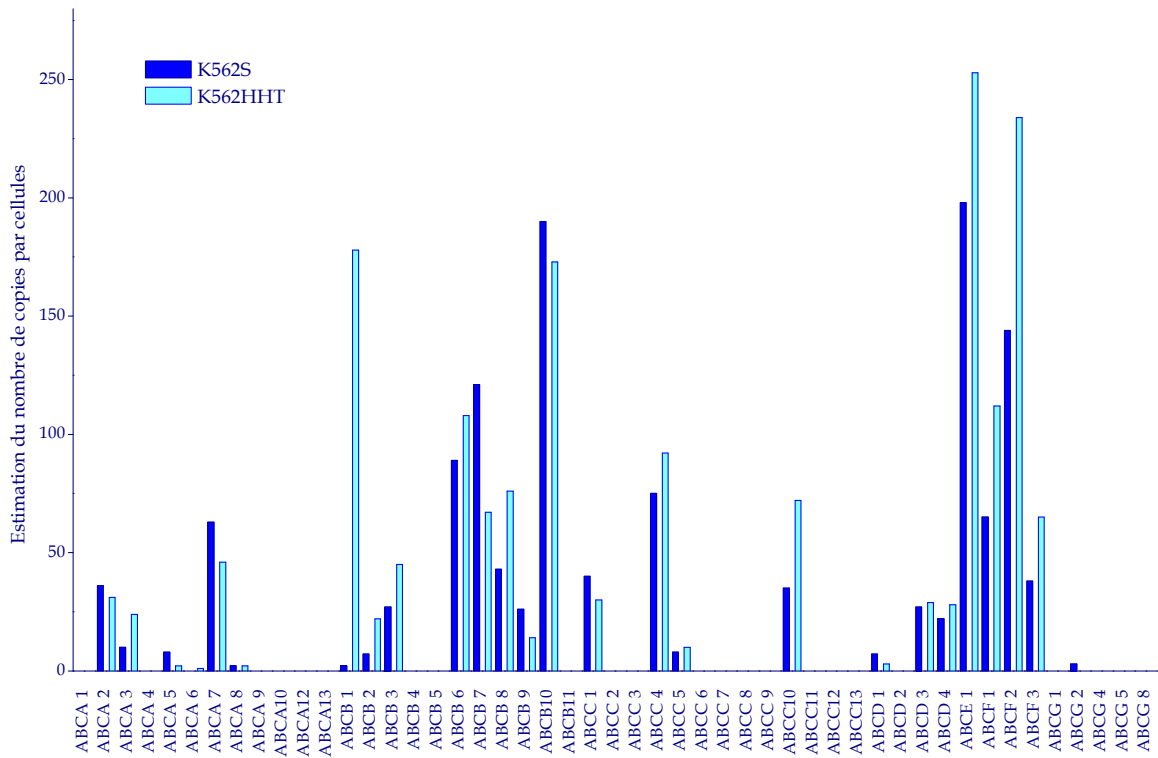


Figure 70 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les K562S et les K562HHT.

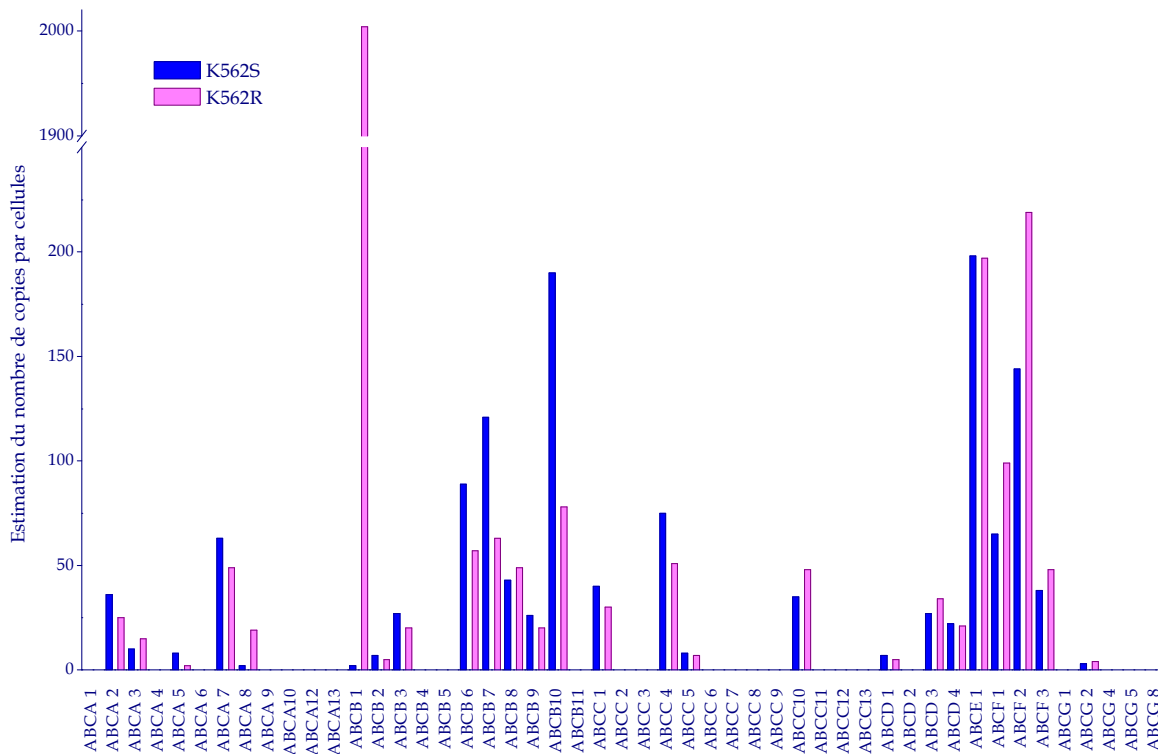


Figure 71 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les K562S et les K562R.

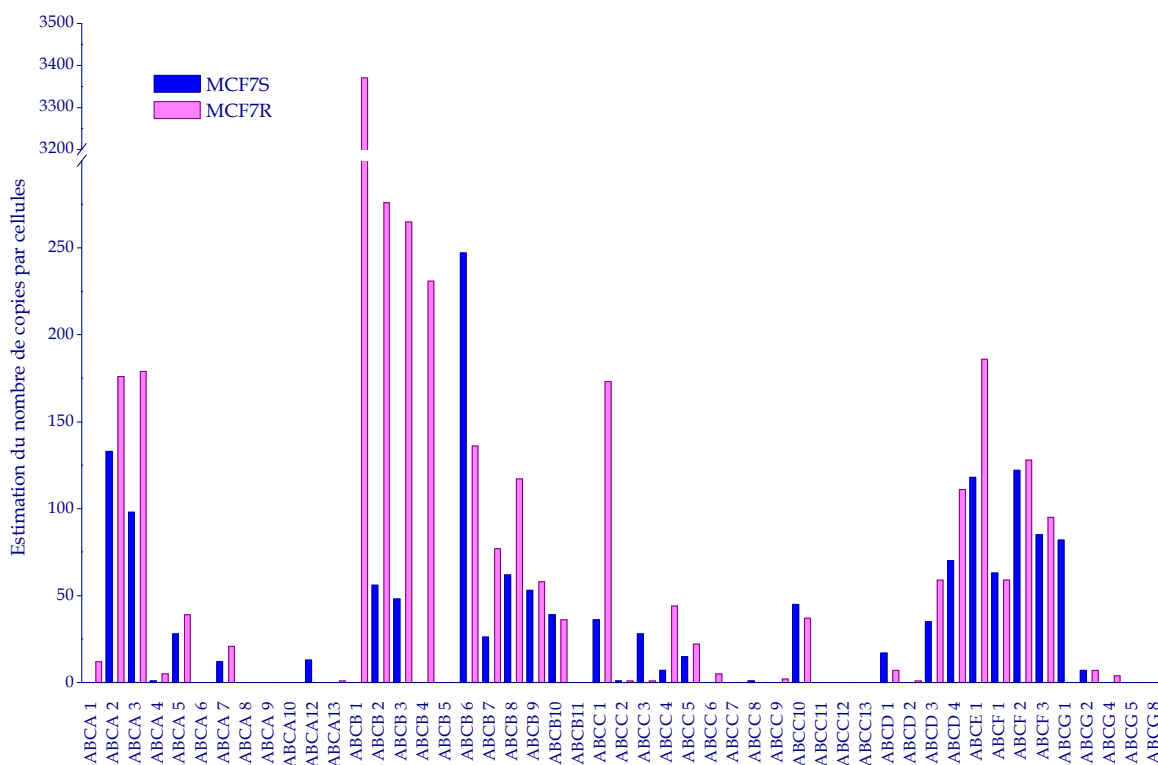


Figure 72 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les MCF7S et les MCF7R.

Pour comparer les variations entre les lignées sensibles et leurs lignées résistantes nous nous sommes alors intéressés aux transporteurs dont l'expression nous semblait très significative, à savoir lorsque dans au moins une des deux lignées l'expression était d'au moins 50 copies de transcrits par cellule. De plus, nous avons sélectionné des variations (entre sensibles et résistants) supérieures à un facteur 2.

Dans les HL60MDR, le seul transporteur ABC dont l'expression augmente en comparaison avec la lignée sensible est ABCB1. Deux transporteurs ABC sont moins exprimés dans la lignée résistante : ABCB2 et ABCB3 dont les expressions passent de 130 copies dans la lignée sensible à 20 (pour ABCB2) et 65 copies (pour ABCB3).

Dans les lignées HL60MRP, 2 transporteurs sont surexprimés. ABCC1 est présent à raison de 32 copies dans la lignée sensible et 470 copies dans la lignée résistante. ABCA2 atteint 50 copies par cellule dans la lignée résistante. L'expression de plusieurs transporteurs diminue dans les HL60MRP : ABCB2, ABCB6, ABCB8 et ABCF1.

Entre les cellules K562HHT40 et K562S, on observe peu de variations d'expression. ABCB1 et ABCC10 augmentent dans les résistantes.

Les variations d'expression de deux gènes sont retenues également entre les K562R et les K562S : ABCB1 augmente dans la lignée résistante, alors qu'ABCB10 est réprimé.

Enfin c'est entre les lignées MCF7 sensible et résistante que l'on observe le plus de variation d'expression. ABCB1 est bien évidemment surexprimé ; mais c'est également le cas d'autres transporteurs. ABCB2, ABCB3 et ABCB4 atteignent 250 copies par cellule dans la lignée MCF7R, et ABCC1 200 copies. ABCB7 est également

surexprimé dans la lignée résistante aux alentours de 80 copies de transcrits. Dans cette lignée seul le transporteur ABCG1 est complètement réprimé par rapport à la lignée sensible.

Il existe aujourd'hui une polémique concernant l'origine de ces cellules MCF7R. En effet, certains travaux ont récemment décrits que la création de cette lignée résistante serait due à une contamination de la lignée originale par un autre type cellulaire (Liscovitch and Ravid 2007). Cette lignée est encore cependant très largement utilisée dans de nombreux travaux.

Nous avons ensuite comparé les profils d'expression des trois lignées sensibles. La Figure 73 illustre les résultats que nous avons obtenus en comparant les trois lignées sensibles. On voit que le transporteur ABCC1 est présent en faible quantité et qu'ABCB1 est absent de ces trois lignées. D'une façon générale, les patterns d'expression de ces 3 lignées sensibles se ressemblent. Il y a cependant quelques différences d'expression, la lignée la plus différente étant MCF7S. A titre d'exemple, le transporteur ABCB6 qui fait partie de la même famille qu'ABCB1 est beaucoup plus exprimé dans MCF7S. De plus, ABCG1 qui lui fait partie de la même sous-famille qu'ABCG2 n'est détecté que dans les MCF7.

Le transporteur ABCC1 est surexprimé dans les lignées HL60MRP (Figure 69), mais beaucoup plus faiblement qu'ABCB1 (environ 180 copies par cellule), de plus ce transporteur est faiblement exprimé, mais toujours présent dans les lignées sensibles (Figure 73) et il est surexprimé dans la lignée MCF7R (Figure 74). Seul ABCB1 atteint des niveaux d'expression bien plus élevés dans les lignées résistantes. Dans les lignées HL60MDR, K562R et MCF7R c'est le transcrit majoritairement exprimé. Il atteint, dans ces lignées résistantes 2 000 copies dans les K562R, 3 400 copies pour les MCF7R et jusqu'à 6 000 copies dans les HL60MDR (Figure 74).

Nous avons confirmé ces résultats par cytométrie de flux pour ces 2 transporteurs (Figure 75). Une bonne corrélation des niveaux d'expression de la protéine ABCB1 avec le nombre de copies de transcrits est observée.

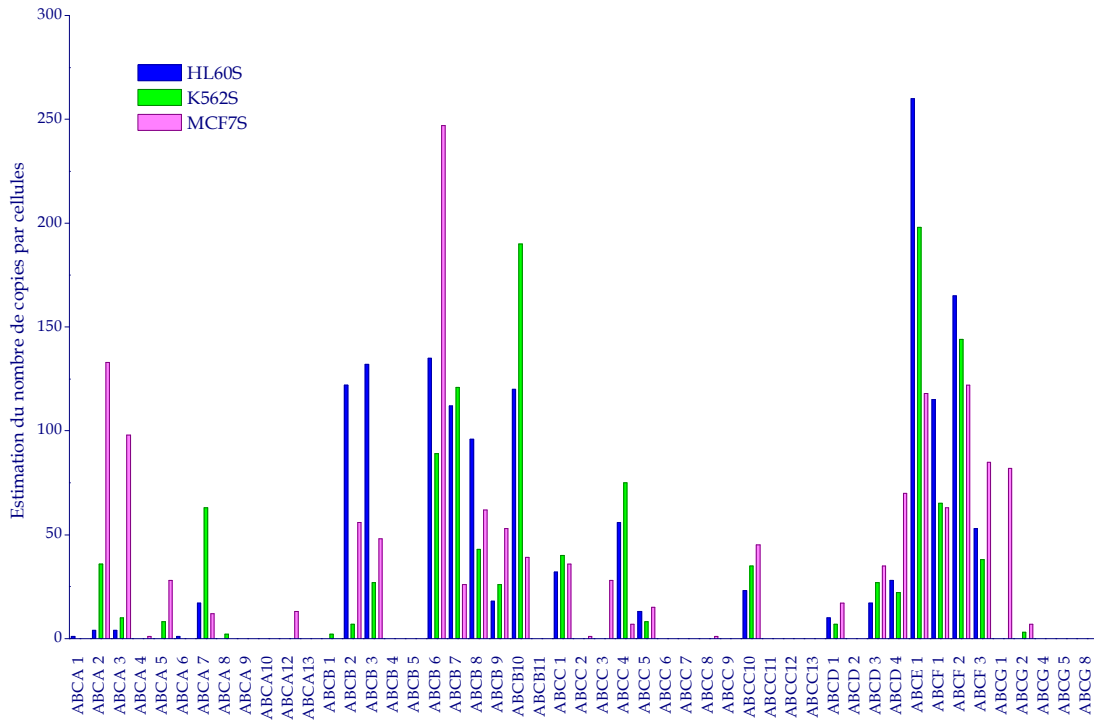


Figure 73 : Comparaison du nombre de copies de transcrits par cellule dans les lignées sensibles.

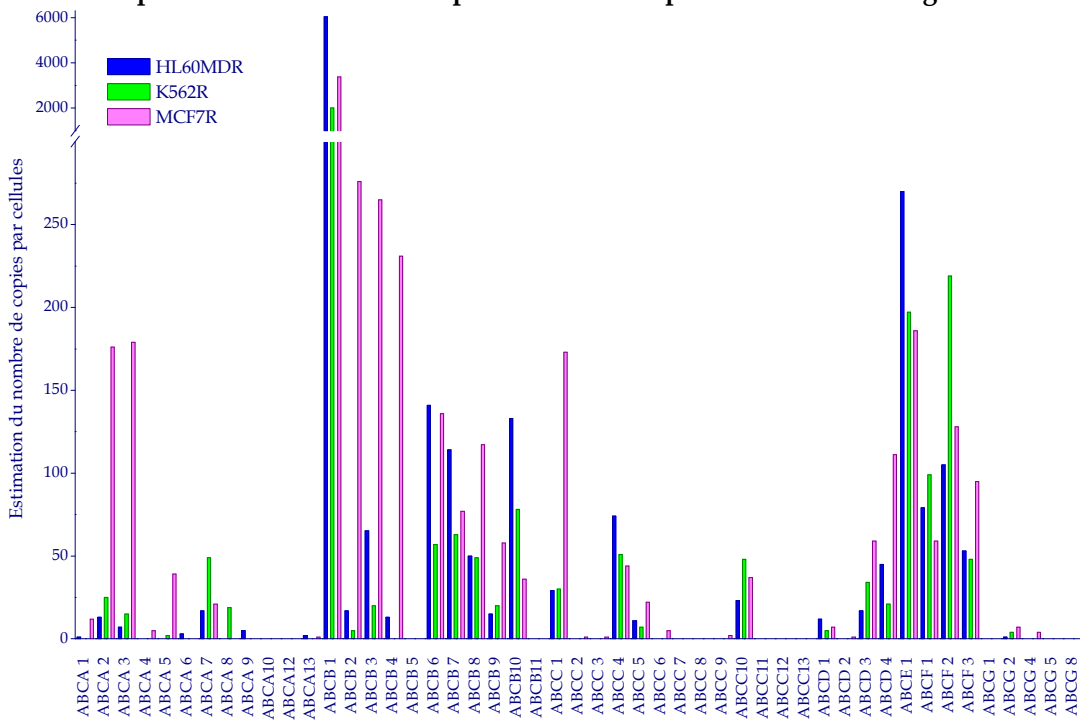


Figure 74 : Comparaison du nombre de copies de transcrits par cellule dans les lignées résistantes.

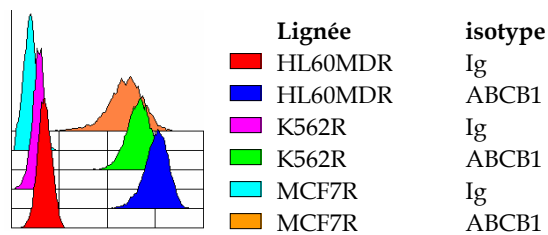


Figure 75 : Comparaison par cytométrie de flux de la présence du transporteur ABCB1.

6.2 Calcul du nombre de copies d'ARN par cellules en utilisant l'ARN ribosomal 18S.

Nous avons voulu vérifier d'une autre manière l'estimation du nombre de copies par cellule. L'article de Peter C. Hollenhorst (Hollenhorst *et al.* 2004), estime que le nombre de copies d'ARN ribosomal 18S par cellule est environ 2.10^6 . Duncan et collaborateurs (Duncan and Hershey 1983), l'évaluent 3.10^6 copies de 18S dans les cellules HeLa. Nous avons utilisé cette estimation du nombre de copies du 18S à 3.10^6 copies par cellule pour nos calculs.

Nous avons tout d'abord calculé, pour chaque gène cible, le facteur F représentant le ratio entre le nombre de copies de 18S et le nombre de copies de gène cible.

$$F = \frac{2^{-Ct_{18S}}}{2^{-Ct_x}}$$

Le nombre de copies par cellule est donc :

$$\text{Nb copies/cell} = \frac{3.10^6}{F}$$

Les valeurs de copies par cellule calculées par cette technique ont le même ordre de grandeur que celles obtenues par le premier calcul. Cette deuxième technique donne cependant des valeurs légèrement plus faibles, il y a environ un facteur 3 entre les deux méthodes de calcul. Les estimations obtenues par cette technique sont représentées en annexe (Figure 79, Figure 80 et Figure 81).

III DISCUSSION

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux variations d'expression des transporteurs ABC sur les lignées cellulaires humaines dites « sensibles » ou rendues résistantes à un cytotoxique. Nous avons comparé l'expression en transporteurs ABC dans ces différentes lignées.

Nous avons eu 2 approches pour analyser nos résultats de PCR quantitative :

- l'analyse classique qui consiste à calculer un ratio de variation entre la lignée résistante et sa lignée sensible correspondante.
- une estimation du nombre de copies de transcrits par cellule qui nous permet d'observer les différences entre nos lignées tout en tenant compte de l'abondance des transcrits.

Cette dernière technique nous donne un message différent de notre analyse avec les RQ. En effet, si l'on compare ces résultats en nombre de copies avec ceux obtenus avec les calculs de RQ les variations qui vont attirer notre attention ne vont pas forcément être les mêmes. Cette fois-ci, l'abondance des transcrits va vraiment être prise en compte. Pour analyser les résultats en nombre de copies, nous nous sommes

intéressés à des transcrits présents à au moins à 50 copies par cellule. Le Tableau 21 montre les résultats que nous avons retenus au paragraphe II3 (avec Ct max=35 ; au moins 1 des 2 échantillons comparés ayant un Ct<30 ; RQ>10) avec ceux auxquels nous nous sommes intéressés au paragraphe II6.1 en nombre de copies (nombre de copie>50 ; facteur de variation >2).

Type cellulaire	tendance	Analyse par RQ	Analyse par nombre de copies
HL60S/MDR	augmente	ABCB1, ABCB4, ABCA9	ABCB1
	diminue	-	ABCB2, ABCB3
HL60S/MRP	augmente	ABCC1, ABCA2, ABCB11	ABCC1, ABCA2
	diminue	ABCB9, ABCA6, ABCB6	ABCB2, ABCF1, ABCB8, ABCB6
K562S/HHT	augmente	ABCB1	ABCB1
	diminue	ABCG2	ABCC10
K562S/K562R	augmente	ABCB1, ABCA8	ABCB1
	diminue	-	ABCB10
MCF7S/MCF7R	augmente	ABCB1, ABCB4, ABCA1, ABCC9, ABCG4, ABCC6	ABCB1, ABCB4, ABCB3, ABCB2, ABCC1, ABCB7
	diminue	ABCG1, ABCA12, ABCC3	ABCG1

Tableau 21: Comparaison des interprétations des résultats obtenus en calculant soit les RQ soit le nombre de copies de transcrits par cellule.

Pour la sélection des résultats, les critères étaient : 1) pour le RQ : Ctmax=35 ; au moins un des 2 échantillons avec Ct<30 ; RQ>10 2) pour le nombre de copies : nombre de copies>50 ; facteur de variation >2.

En bleu ciel sont surlignés les éléments communs aux deux types d'analyse.

Les résultats que nous avons obtenus en nombre de copies de transcrits par cellule restent des estimations, mais peuvent être très utiles quant à l'interprétation des résultats. La technique de PCR quantitative est une technique très sensible qui permet d'obtenir rapidement de nombreuses données. Cependant, l'analyse des résultats, sans prendre les précautions nécessaires, peut induire des erreurs en faisant apparaître des ratios très élevés sur des gènes dont l'expression est extrêmement faible.

Abondance des ARNm des transporteurs ABC

La Figure 76 est une représentation qui permet d'avoir une vue générale de l'expression de l'ensemble des transporteurs ABC dans les 8 lignées cellulaires.

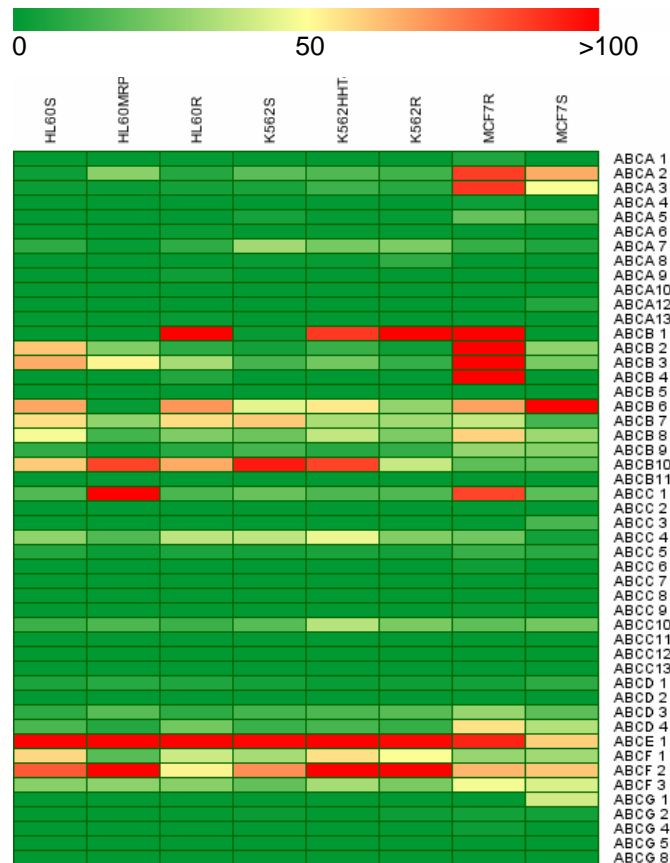


Figure 76 : Représentation schématique de l'abondance de l'ensemble des transporteurs ABC dans nos 8 lignées cellulaires.

Ce cluster illustre le nombre de copies d'ARNm dans les lignées cellulaires. Les gènes faiblement exprimés sont représentés en vert. Le jaune correspond à une expression moyenne; et enfin en rouge les gènes les plus fortement exprimés.

Notre estimation du nombre de copies d'ARNm nous montre que les transporteurs les plus exprimés dans ces lignées sont présents à hauteur de 100 à 250 copies par cellule ; ce qui correspond en comparaison avec l'ensemble des transcrits à des gènes modérément exprimés. Certains gènes comme la sous famille ABCE ou F sont bien exprimés dans ces lignées or leur fonction n'est pas encore bien caractérisée. Cependant ces gènes ne seraient pas impliqués dans la résistance.

Afin d'avoir une idée de l'abondance de l'ensemble des transporteurs ABC nous avons calculé le pourcentage de répartition des transcrits ABC dans nos 8 lignées (Figure 77). On peut remarquer que la majorité des gènes ont une expression se situant en dessous de 50 copies de transcrits par cellule (77% des ABC transporteurs). Ce qui représente des transcrits faiblement exprimés. Seuls 12% des ABC ont une expression supérieure à 100 copies.

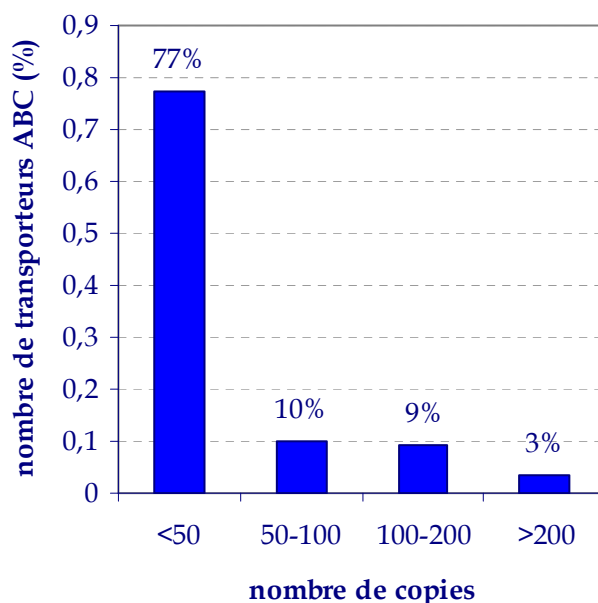


Figure 77 : Répartition du nombre de copies des transporteurs ABC dans les 8 lignées cellulaires

Certains transporteurs dont les fonctions sont inconnues sont très exprimés dans les lignées cellulaires

La famille des transporteurs ABC comprend environ 50 membres chez l'homme. Parmi ces transporteurs, certains très étudiés ont une fonction bien caractérisée. D'autres sont beaucoup moins étudiés. Cependant, dans notre étude sur les lignées cellulaires, nous avons pu voir que certains de ces transporteurs, dont la fonction reste jusqu'à présent inconnue, sont présents en grandes quantités dans nos lignées cellulaires. En effet, en plus d'ABCC1, d'autres transporteurs sont très bien représentés dans ces cellules. Des transporteurs des sous-familles A (ABCA2, ABCA3), B (ABCB2, ABCB3, ABCB6, ABCB8, ABCB9, ABCB10), E et F (ABCE1, ABCF1 et ABCF2) ainsi qu'ABCC10 sont très fortement exprimés. Mise à part ABCB2 et ABCB3, ces transporteurs sont très peu étudiés. Etant donné les forts niveaux d'expression de ces transporteurs, de plus amples études sur leur pattern d'expression dans différents tissus mériteraient d'être effectuées.

Analyse des variations d'ABCB1 et ABCC1 dans les lignées cellulaires

Nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'expression des transporteurs ABCB1 et ABCC1. L'un ou l'autre étant connus pour être surexprimés dans ces lignées. La Figure 78 représente l'estimation du nombre de copies de transcrit par cellule de ABCB1 et ABCC1. On remarque que dans les cellules sensibles, ABCB1 est complètement absent. L'amplification d'ABCB1 pour obtenir une résistance est importante, on passe de 0 à 200 copies dans une lignée résistante modérée (K562HHT40) et jusqu'à 6 500 copies dans la lignée HL60MDR. Par opposition, ABCC1 est présent dans toutes les lignées à environ 30 à 40 copies par cellule et le facteur d'amplification qui conduit à la résistance est lui seulement de 15 fois. Ce

facteur d'augmentation d'ABCC1, qui confère aux lignées cellulaires une résistance aux cytotoxiques, est très faible comparé à celui d'ABCB1.

La résistance de la lignée MCF7R n'est attribuée qu'à ABCB1 dans la littérature. Or nous voyons le transporteur ABCC1 augmenter. Dans cette même lignée, nous avons vu qu'ABCC1 était présent et son niveau d'expression pourrait contribuer au phénotype de résistance de ces cellules.

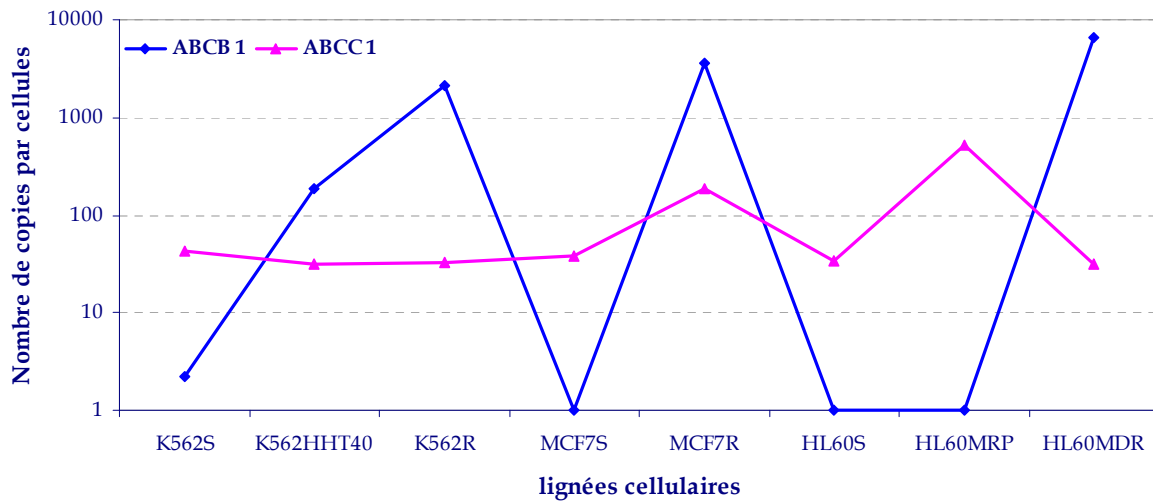


Figure 78 : Estimation du nombre de copies d'ABCB1 et ABCC1 dans les lignées sensibles et résistantes

IV ANNEXE

Les figures représentées en annexe sont les résultats obtenus en comparant avec le nombre de copies d'ARN ribosomal 18S.

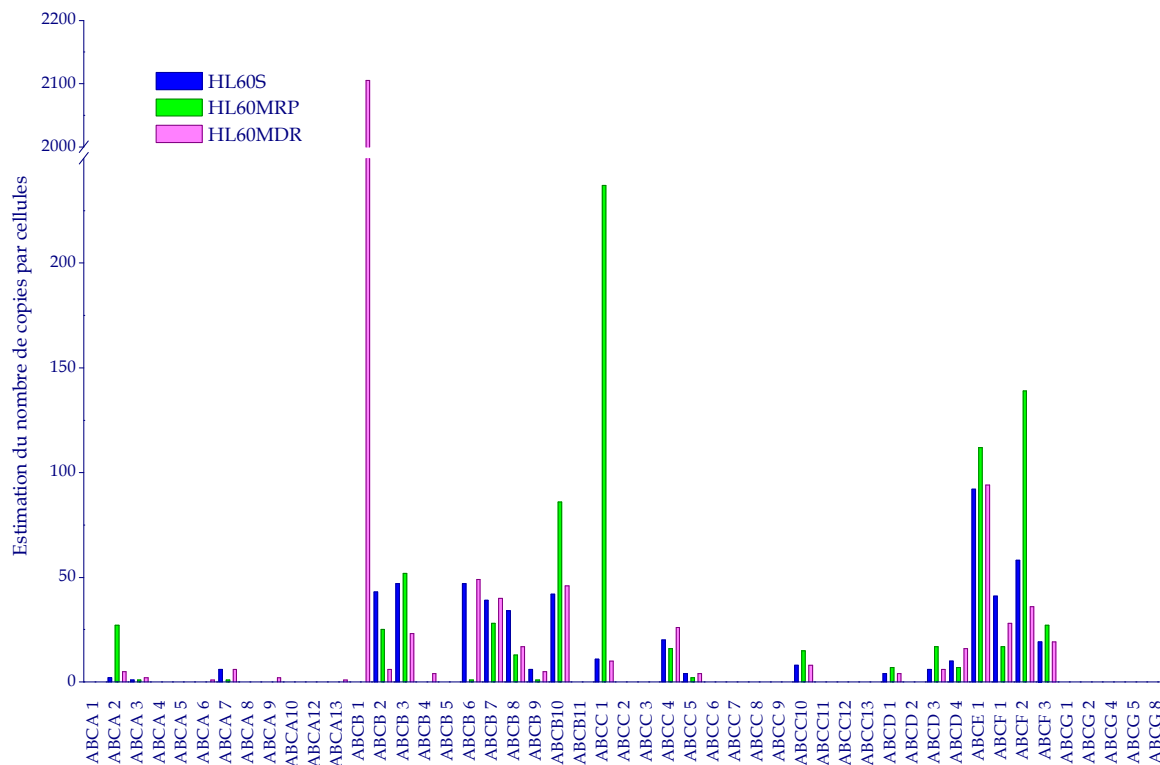


Figure 79 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les HL60S, les HL60MDR et les HL60MRP.

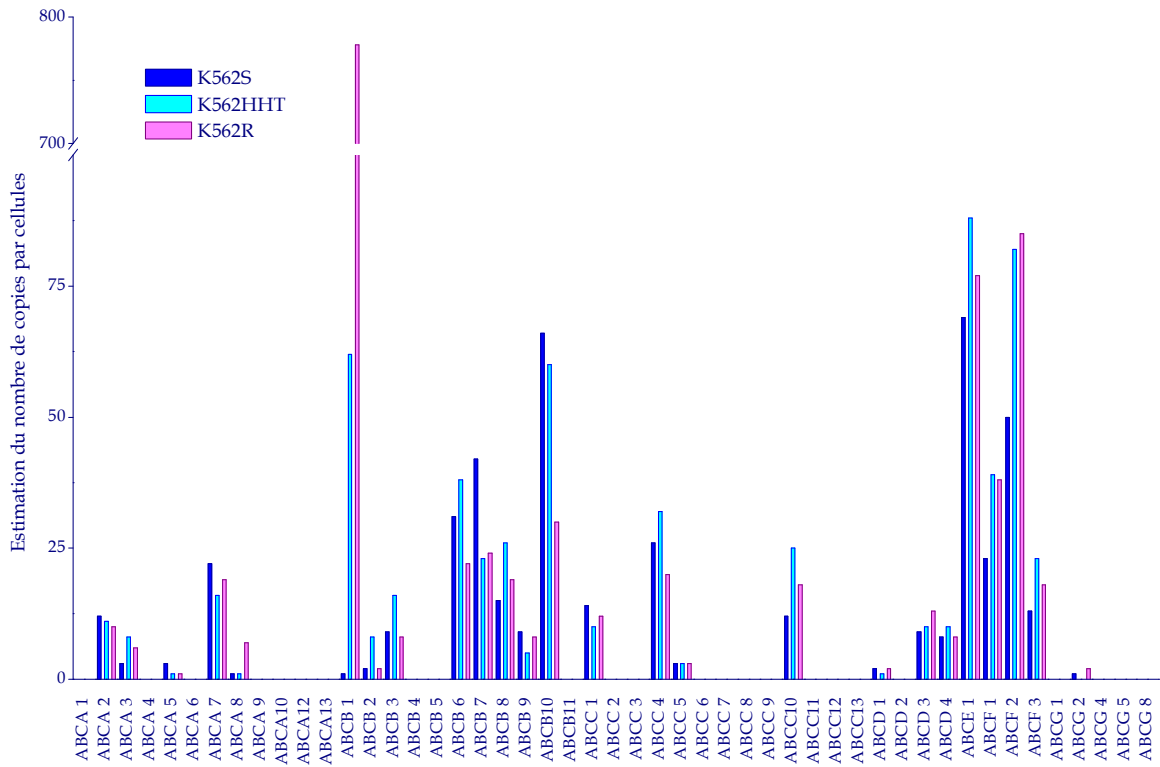


Figure 80 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les K562S, les K562HHT et les K562R.

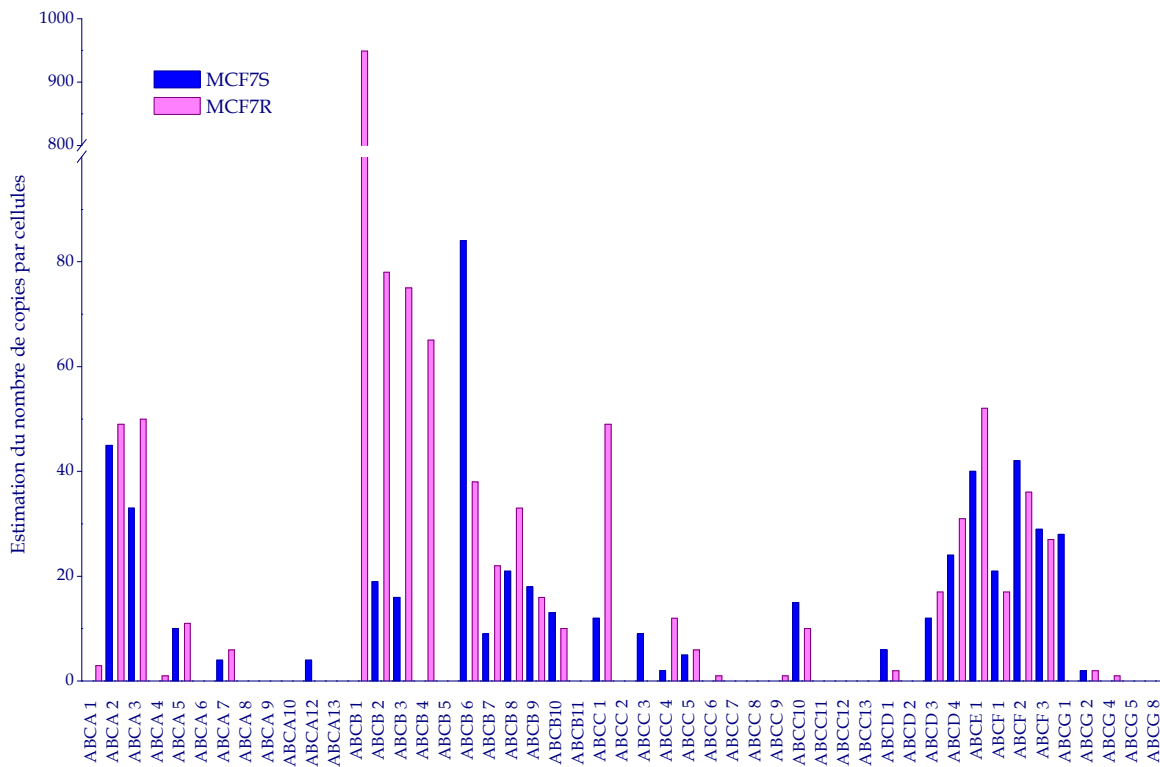


Figure 81 : Estimation du nombre de copies de transcrits par cellule dans les MCF7S et les MCF7R.

V BIBLIOGRAPHIE

- Barraud, L., P. Merle, E. Soma, L. Lefrancois, S. Guerret, M. Chevallier, *et al.* (2005). "Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo." J Hepatol **42**(5): 736-43.
- Benard, J. and O. Rixe (1996). "[Resistance to anticancer drugs]." Presse Med **25**(35): 1724-30.
- Biedler, J. L. and H. Riehm (1970). "Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies." Cancer Res **30**(4): 1174-84.
- Bikfalvi, A. (2003). "[Tumor angiogenesis]." Bull Cancer **90**(5): 449-58.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, *et al.* (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-4.
- Doyle, L. A., W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A. K. Rishi, *et al.* (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-70.
- Duan, Z., K. A. Brakora and M. V. Seiden (2004). "Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells." Mol Cancer Ther **3**(7): 833-8.
- Duncan, R. and J. W. Hershey (1983). "Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis." J Biol Chem **258**(11): 7228-35.
- Gillet, J. P., T. Efferth and J. Remacle (2007). "Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes." Biochim Biophys Acta **1775**(2): 237-62.
- Hollenhorst, P. C., D. A. Jones and B. J. Graves (2004). "Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors." Nucleic Acids Res **32**(18): 5693-702.
- Johnsson, A., J. Vallon-Christensson, C. Strand, T. Litman and J. Eriksen (2005). "Gene expression profiling in chemoresistant variants of three cell lines of different origin." Anticancer Res **25**(4): 2661-8.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.
- Liscovitch, M. and D. Ravid (2007). "A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells." Cancer Lett **245**(1-2): 350-2.
- Smith, A. J., A. van Helvoort, G. van Meer, K. Szabo, E. Welker, G. Szakacs, *et al.* (2000). "MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping." J Biol Chem **275**(31): 23530-9.

Discussion générale

Durant les 30 dernières années, il a été démontré que diverses pathologies humaines ainsi que l'un des principaux mécanismes responsables de la multirésistance aux drogues sont liés à l'activité fonctionnelle de différents transporteurs ABC. Les protéines ABC forment une famille de protéines membranaires, qui sont trouvées dans tout le règne vivant. Ces transporteurs peuvent prendre en charge une grande variété de substrats et participent à de nombreuses fonctions cellulaires. Ils régulent la perméabilité au niveau des barrières pharmacologiques. Dans le foie, l'appareil gastro-intestinal et le rein, les transporteurs ABC excrètent des toxines, protégeant de ce fait l'organisme. Ils jouent également un rôle actif dans le système immunitaire en transportant les peptides du réticulum endoplasmique vers les molécules du CMH de classe I. Enfin, ils participent au transport et à l'homéostasie cellulaire des lipides. La variété de substrats et de fonctions assurés par les transporteurs ABC, explique leur implication dans des physiopathologies génétiques très diverses. Par leur capacité de transport de molécules cytotoxiques, certains transporteurs ABC ont été associés à la multirésistance aux drogues. Il existe dans cette famille de protéines de fortes homologies de séquence, de structure et de mécanisme fonctionnel. Le fait qu'une même molécule puisse être substrat de plusieurs transporteurs ABC et qu'un transporteur ABC puisse transporter des substrats de natures diverses rend complexe leur étude fonctionnelle ainsi que la compréhension exacte de leur rôle dans la physiologie cellulaire.

Bien que les rôles de quelques uns de ces transporteurs ABC soient maintenant largement étudiés, la fonction et les substrats de nombre d'entre eux restent encore inconnus. Malgré l'implication d'un grand nombre de transporteurs ABC dans des physiopathologies humaines, la cartographie précise de l'expression de l'ensemble de ces protéines dans des tissus humains n'a pas encore été entièrement établie. C'est dans ce contexte que nous avons développé l'étude de l'expression des transporteurs ABC humains et murins dans différents tissus ou lignées cellulaires utilisées comme modèle pour des tests de cytotoxicité.

Nous avons tout d'abord développé au laboratoire la technique de PCR quantitative utilisant le SYBR Green. Etant donné le grand nombre d'échantillons et de transcrits testés pour notre projet, cette technique s'est rapidement révélée très fastidieuse en raison de son faible débit et des problèmes observés de spécificité de sondes. Nous avons ensuite conçu une puce à oligonucléotides dédiée aux transporteurs ABC, cette technique étant plus adaptée à un criblage à haut débit. Cependant, la technologie que nous avons choisie n'a pas permis une quantification précise et s'est révélée difficile à

normaliser. Nous avons donc préféré développer au laboratoire la PCR quantitative à haut débit en utilisant des sondes TaqMan. Nous avons conçu des cartes microfluidiques (TaqMan Low Density Array) permettant de quantifier simultanément l'expression de tous nos gènes d'intérêt (transporteurs ABC et gènes de référence) chez l'homme ou la souris. Cette technique s'est révélée très sensible et reproductible. Elle nous a permis de réaliser simultanément 384 dosages, qui associés à une robotisation permet d'effectuer jusqu'à 5000 dosages par jour. Cette méthode permet une détection rapide et des transcrits en utilisant seulement de très faibles quantités d'ARN total.

Nous avons montré dans des échantillons de foies humains la forte expression de certains transporteurs ABC, pour lesquels aucun rôle n'a été décrit dans le foie. Nous avons également établi la première cartographie de l'expression des transporteurs ABC au cours du développement hépatique. Ceci nous a permis de montrer que certains transporteurs absents du foie foetal s'expriment après la naissance et jouent probablement un rôle dans la physiopathologie du foie adulte. A l'inverse l'expression de certains transporteurs s'éteint après la naissance suggérant un rôle éventuel dans l'hématopoïèse.

Alors que les expressions d'ABCB1 et ABCC1 sont couramment testées en clinique pour suivre l'évolution de certains cancers, la participation potentielle d'autres transporteurs ABC dans le phénomène de résistance reste inexplorée. Nous avons montré par l'étude de patients atteints de leucémie qu'une plus forte expression d'ABCB1 et ABCG2, chez les patients avant chimiothérapie, corrélait avec un mauvais pronostic. De façon intéressante, nous avons également montré que d'autres transporteurs qui jusqu'à présent n'ont pas été décrits dans la résistance pourraient également contribuer à ce mauvais pronostic. Ces résultats soulignent l'intérêt d'élargir le dosage de transporteurs ABC lors d'études cliniques.

Notre étude du transcriptome ABC s'est étendue à des cellules qui à terme seront peut-être des outils thérapeutiques : les cellules souches. Dans ces cellules, seuls les transporteurs ABCB1 et ABCG2 ont généralement été étudiés. Nous avons élargi cette caractérisation à l'ensemble des membres de cette famille. Nous avons comparé le pattern d'expression des transporteurs ABC dans des cellules souches humaines à différents stades de développement. Certains transporteurs pour lesquels nous observons des variations d'expression pourraient caractériser un état de différenciation et être impliqués dans l'autorenouvellement ou la différenciation des cellules souches.

Dans le cadre de l'utilisation de la colchicine afin d'améliorer les symptômes de patients atteints de mucoviscidose, nous avons étudié l'effet d'un traitement colchicine sur des lignées cellulaires humaines et sur des souris. Nous avons montré qu'un traitement colchicine permettait d'induire l'expression de transporteurs ABC dans les lignées et in vivo chez la souris. Cependant les effets chez la souris ont été

observés essentiellement dans le foie. Nous avons également pu montrer que ce traitement colchicine permettait de réguler l'expression de gènes impliqués dans la physiopathologie de la mucoviscidose.

Compte tenu de l'importance des transporteurs ABC dans les pathologies humaines, il nous paraît essentiel de mieux quantifier l'expression de l'ensemble des gènes de cette famille. Cette cartographie de l'expression des transporteurs ABC révèle certaines variations très significatives qui devront être étudiées également au niveau protéique et fonctionnel. Les transporteurs ABC pouvant constituer des cibles utiles en thérapie, ce pattern d'expression de l'ensemble des membres de cette famille permettra : de mieux sélectionner les molécules à utiliser, prédire l'efficacité des traitements, d'identifier des agents régulateurs, et donc de mieux définir les stratégies thérapeutiques.

MATERIELS ET METHODES

1 Matériel biologique

1.1 Animaux :

Souris C57/Bl6

Toutes les expériences sur animaux ont été réalisées d'après les recommandations pour l'expérimentation animale du NIH et du comité national d'éthique.

Les souris utilisées sont des souris mâle C57/Bl6 (IFFA Credo, Charles River ou Janvier). En début de traitement les souris sont âgées de 6 à 7 semaines et pèsent entre 21g à 28g.

Traitements

Les traitements de souris se font par des injections en intrapéritonéales. Pour chaque injection 100 µl de produit est injecté par souris soit:

- une solution de sérum physiologique
- une solution de colchicine à 0,5mg/ml dilué dans du sérum physiologique

Durée du traitement	mg/kg/injection	nombre d'injections	mg totaux injectés
7 heures	2	1	0,05
24 heures	2	1	0,05
44 jours	2	5	0,25

Prélèvements

A la fin du traitement pendant 44 jours avec la colchicine, les souris traitées étaient affaiblies et maigres, mais vivantes. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Après sacrifice, leurs foies apparaissent gros et tachetés en comparaison avec les souris témoins.

Pour la dissection de tissus, nous utilisons des instruments de microchirurgie stériles. Les échantillons d'organes sont coupés en morceaux (< 0,5 cm²), sont transférés dans des tubes stériles et sont immédiatement congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

1.2 Les lignées cellulaires :

Les cellules ont été cultivées à 37°C sous atmosphère contenant 5% de CO₂ dans le milieu RPMI 1640 Medium + GlutaMAX™ (GIBCO™, Invitrogen life technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal.

Les lignées cellulaires ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr. Jean-Pierre Marie. Nous disposons de trois types de lignées cellulaires : une lignée myéloïde aiguë (HL60), une lignée myéloïde chronique (K562) et une lignée d'adénocarcinome mammaire (MCF7). Pour ces lignées nous disposons de la lignée dite sensible et des lignées dont la résistance avait été induite par différents cytotoxiques.

Types cellulaire	désignation	résistance
HL60	HL60S	-
	HL60R	daunorubicine (10 ⁻⁶ M)
	HL60MRP	doxorubicine (10 ⁻⁶ M)
K562	K562S	-
	K562R	doxorubicine (10 ⁻⁶ M)
	K562HHT40	homoharringtonine (40ng/ml)
MCF7	MCF7S	-
	MCF7R	doxorubicine (10 ⁻⁶ M)

Les lignées cellulaires myéloïdes sensibles HL60 et K562 ont été également traitées pendant 48h et 72 heures avec de la colchicine (Sigma Aldrich).

1.3 Les échantillons de foies humains :

Les prélèvements hépatiques (5-100g) utilisés dans cette étude ont été récoltés *postmortem* selon les recommandations du comité d'éthique de l'INSERM, dans l'heure suivant le décès et congelés immédiatement dans l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C. Les foies adultes sont issus de donneurs pour transplantation rénale. Les foies de nouveaux nés ont été obtenus après consentement parental éclairé.

1.4 Les échantillons de blastes humains

Les échantillons de blastes ont été obtenus par ponction médullaires sur des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, avant traitement.

2 Manipulation d'ARN :

Les ARN sont facilement dégradés par les ARNases, enzymes omniprésentes, en particulier sur la peau, et par conséquent sur tous les objets et surfaces de travail. L'action des ARNases peut engendrer des résultats faussement négatifs. Il est donc impératif d'observer certaines règles :

Avant chaque manipulation d'ARN, pipettes et surface de travail sont nettoyées minutieusement. Les paillasses sont décontaminées avec une solution RNase Away (Molecular BioProducts). Le matériel utilisé à usage unique est garanti sans ARNase (eppendorfs, cônes à filtre, eau de qualité Biologie Moléculaire). Les manipulations se font avec des gants non talqués. Dès leur obtention ou leur décongélation, les ARN sont déposés sur la glace, les enzymes de dégradation étant peu actives à froid.

2.1 Extraction d'ARN

A partir de lignées cellulaires humaines :

Les ARN totaux sont extraits avec le kit Total RNA Isolation Nucleospin® RNA II (MACHEREY-NAGEL). Chaque échantillon de $5 \cdot 10^6$ cellules est repris dans le tampon lyse RA1 contenant de l'isothiocyanate de guanidium et du β -mercaptoéthanol ($10 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$). Ensuite, l'échantillon est filtré sur une colonne permettant d'éliminer la majeure partie des débris cellulaires. De l'éthanol à 70% est ensuite ajouté au lysat. Le tout est mélangé, puis transféré sur une membrane de silice fixant préférentiellement les ARN. Après un premier lavage, les ARN sont soumis à un traitement à l'ADNase I pendant 15 minutes à température ambiante. Ce traitement permet d'éliminer l'ADN résiduel présent sur la membrane. L'ADNase I est inactivée, puis la colonne est lavée deux fois avec un tampon contenant de l'éthanol. Après séchage par centrifugation, les ARN sont élués dans $60 \mu\text{l}$ d'eau pure garantie sans ARNase.

A partir d'organes murins :

L'extraction d'ARN à partir de tissus solides nécessite une lyse mécanique. Brièvement, 50 à 100 mg de tissus sont homogénéisés dans 1ml TRIzol® Reagent (GibcoBRL, Invitrogen Life Technologies) à l'aide d'un ULTRA-TURRAX T8 (IKA®-WERKE). Les membranes extracellulaires, les polysaccharides, et les ADN de haut poids moléculaire sont éliminés par centrifugation. La première étape d'extraction correspond à une extraction phénol-chloroforme. L'addition de chloroforme ($200 \mu\text{l}/\text{ml}$ de TRIzol) suivie d'une centrifugation (15 minutes à 4°C à $12000g$) permet la séparation de la phase aqueuse qui contient les ARN de l'interphase et de la phase organique qui contient l'ADN et les protéines. Les ARN sont ensuite précipités 10 minutes à température ambiante avec de l'isopropanol ($0,5 \text{ ml}/\text{ml}$ de TRIzol). Après centrifugation 10 minutes à $12000g$ et le culot d'ARN est remis en suspension dans tampon de lyse RA1 mélangé à $350 \mu\text{l}$ d'éthanol à 70%. Puis dans un souci de propreté et de qualité des ARN nous déposons les ARN obtenus par cette méthode sur une colonne de silice. Le tout est transféré sur une membrane de silice du kit Total RNA Isolation Nucleospin® RNA II (MACHEREY-NAGEL) et l'extraction d'ARN se poursuit comme précédemment selon les instructions du fabricant.

2.2 Dosage, contrôle de la pureté, de la stabilité et stockage des ARN

- La concentration d'une solution d'ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop Inc.). Une densité optique de 1 correspond à une concentration de 40µg/ml d'ARN simple brin. La concentration des échantillons est estimée par la formule suivante :

$$\text{concentration (ng.}\mu\text{l}^{-1}) = \text{absorbance}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{facteur de dilution}$$

- La pureté des préparations est indiquée par le rapport de l'absorbance à 260nm sur l'absorbance à 280nm. Une préparation d'ARN pure aura un rapport $\text{abs}_{260\text{nm}}/\text{abs}_{280\text{nm}}$ compris entre 1,9 et 2,1.

- L'intégrité des préparations d'ARN est vérifiée avec le kit RNA 6000 Nano, déposés sur une puce Agilent RNA 6000 Nano LabChip et analysés avec un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Un mélange de gel filtré-marqueur fluorescent est déposé sur la puce. Un tampon est alors ajouté dans chaque puits, afin de placer ensuite les échantillons et le marqueur de poids moléculaire. La puce est vortexée afin d'homogénéiser tampon et échantillon, puis placée dans l'appareil. Lors de l'analyse, les brins nucléiques vont être séparés en fonction de leur taille. Cette technique permet ainsi de détecter une éventuelle dégradation des ARN, mais elle permet également de vérifier qu'il n'y a pas de contamination par de l'ADN génomique.

- Afin d'éviter leur dégradation, les ARN sont conservés à -80°C.

3 Puces à ADN

3.1 Blocage des lames

Afin d'éliminer toute trace de poussière, les lames sont tout d'abord lavées sous agitation, à température ambiante 5 minutes dans un premier tampon contenant 0,1% de Triton X-100. Les lames sont ensuite lavées 2 fois pendant 2 minutes dans une solution contenant de l'acide chlorhydrique (100µl HCl à 37% dans 1 litre H₂O). Les lames sont alors lavées 10 minutes dans une solution de Chlorure de potassium à 100mM avant d'être rincées 1 minute dans de l'eau désionisée. Le blocage des lames se fait pendant 15 minutes dans une solution à pH 7,9 contenant de l'éthanolamine à 50mM et 0,1% de SDS chauffée à 50°C. Les lames sont séchées par centrifugation.

3.2 Synthèse et marquage des ADNc

La synthèse et le marquage des ADNc ont été effectués avec le kit SuperScript™ Plus Indirect ADNc Labelling System (Invitrogen, Life Technologies). L'étape de dénaturation a été réalisée dans un volume final de 18 µl. 20 µg d'ARN totaux 5 µg d'amorces Oligo(dT)₂₀ et des amorces hexamères aléatoires, sont chauffés à 70°C pendant 15 minutes. Le tube est ensuite placé dans la glace pendant 1 minute. L'étape de rétrotranscription se fait en présence de tampon 5X (5X First-Strand Buffer), de DTT, d'un mélange de nucléotides Triphosphate incluant des nucléotides amino-modifiés (dNTP mix), d'un inhibiteur d'ARNase (RNaseOUT™) et l'enzyme SuperScript™ III RT dans les conditions décrites par le fabricant. Le tube contenant un volume final de 30 µl est mélangé puis incubé à 46°C pendant 3 heures. Une fois l'ADNc synthétisé une hydrolyse alcaline de l'ARN est immédiatement réalisée en ajoutant 15 µl de NaOH 1N à la réaction, puis en incubant à 70°C pendant 10 minutes. Le pH est neutralisé en ajoutant 15 µL d'Acide Chloridrique 1N.

Une fois synthétisé, l'ADNc va être purifié. Pour cela du tampon d'hybridation contenant de l'isopropanol est ajouté au mélange d'ADNc. Le tout est déposé sur une colonne. Après centrifugation, la colonne est lavée avec un tampon contenant de l'éthanol, puis séchée par centrifugation. L'ADNc purifié est élué dans 20 µl d'eau, puis déshydraté dans un speed vac jusqu'à avoir un volume de 3 µl. Chaque marqueur fluorescent Alexa Fluor® 555 et Alexa Fluor® 647 sont repris dans du Diméthyl Sulfoxyde (DMSO). Un tampon de couplage et les marqueurs fluorescent sont alors ajoutés à l'ADNc, le tout est vortexé, et incubé à température ambiante à l'abri de la lumière. Après deux heures d'incubation, les ADNc marqués sont purifiés comme précédemment et sont élués chacun dans 20 µl d'eau. Les ADNc marqués ainsi obtenus sont appelés « cibles ».

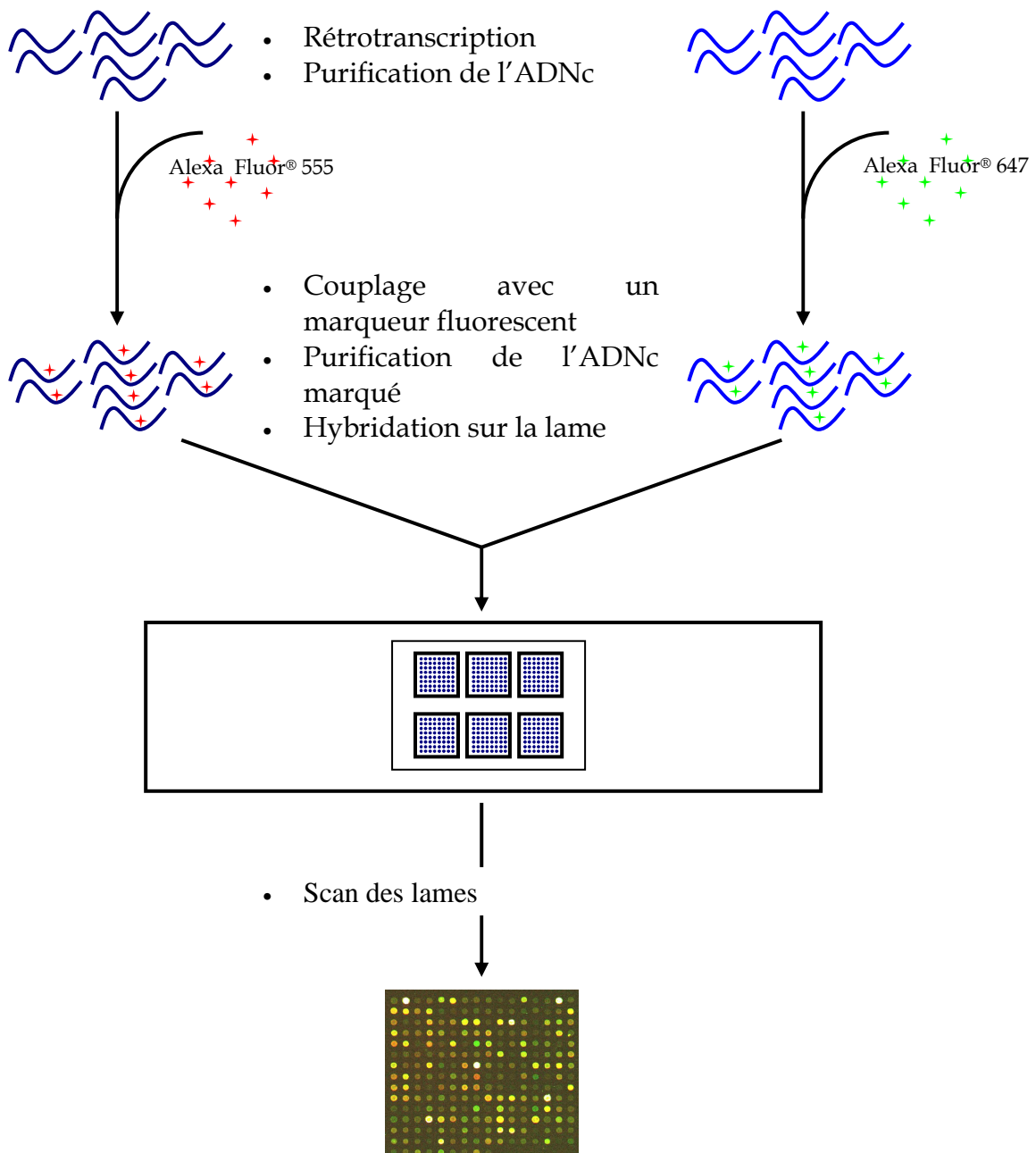
Les ADNc marqué avec l'Alexa Fluor® 555 et Alexa Fluor® 647 sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop Inc.). 1 µl de chaque ADNc marqué est prélevé, migré sur gel d'agarose, et scanné dans un scanner LS 400 4 lasers (Genomic Solutions).

3.3 Hybridation - Lavages

100 à 200 pmol d'ADNc marqué par chaque Alexa sont lyophilisées et repris ensemble dans 20 µl de tampon d'hybridation fourni par MWG.

L'ADNc est ensuite dénaturé à 90°C pendant 3 min, puis il est déposé sur la lame époxy-silane au niveau de la région de spotting et recouvert par une lamelle de verre. La lame est déposée dans une chambre d'hybridation manuelle (Corning) et incubée dans un bain marie pendant 10 minutes à 65°C, puis 20 heures à 42°C.

La lamelle est décollée délicatement dans du Saline-sodium citrate buffer (SSC) 2X contenant 0,1% SDS (la solution préchauffée à 30°C). La lame est lavée pendant 5 minutes dans le même tampon, puis 2 fois pendant 5 minutes dans un tampon SSC 1X et pour finir 2 fois pendant 5 minutes dans un tampon SSC 0,2X.



3.4 Acquisition d'images en fluorescence

Les images sont obtenues avec le scanner LS 400 4 lasers (Genomic Solutions). La première étape fondamentale du processus d'acquisition des données est l'obtention des images (Leung et Cavalieri, 2003). Elle consiste à détecter la fluorescence émise à la surface de la lame après excitation des fluorophores. Le procédé utilisé combine un laser, pour exciter les fluorophores, et un microscope confocal (ou scanner) couplé à un tube photo-multiplieur (PMT) pour analyser les photons émis par les marqueurs (Schna, 1999). L'ajustement le plus couramment utilisé consiste à régler le gain du PMT de façon à ne conserver qu'un nombre minimal de plots présentant

des pixels saturés (de l'ordre de 1 %). Cette mesure permet de conserver une gamme dynamique étendue pour les intensités de fluorescence (Leung et Cavalieri, 2003) pour laquelle les intensités sont en relation linéaire avec l'abondance des transcrits (Ramdas *et al.*, 2001 ; Taylor *et al.*, 2001). Smyth *et al.* (2003) prétendent même que, tant que la saturation n'est pas atteinte, l'effet du réglage du PMT est pratiquement négligeable sur la qualité des mesures. Leung et Cavalieri (2003) suggèrent donc d'équilibrer systématiquement les valeurs de PMT pour la détection des canaux afin de minimiser la variabilité des résultats obtenus.

Les canaux de lecture correspondant aux longueurs d'onde 635 nm et 532 nm sont utilisés pour lire respectivement la fluorescence de l'Alexa Fluor[®]647 et celle de l'Alexa Fluor[®]555. Le signal pour chaque fluorochrome est mesuré par la somme des intensités des pixels du plot. Cette somme représente la quantité totale de cibles hybridées sur les sondes (Dudoit *et al.*, 2002). Ces deux images obtenues, en niveau de gris, représentent les intensités de fluorescence lues par le scanner qui reflètent le niveau d'expression des gènes dans les deux conditions expérimentales. Elles sont souvent représentées en fausse couleur. Le vert sert ainsi à caractériser l'échantillon marqué en Alexa Fluor[®]555, le rouge est réservé à l'Alexa Fluor[®]647 et le jaune permet d'indiquer que les cibles marquées en Alexa Fluor[®]555 et Alexa Fluor[®]647 sont hybridées en proportion égale sur un plot.

4 PCR quantitative

4.1 PCR en SYBR Green

- Afin de générer des fragments d'ADN complémentaire à partir des ARN totaux, une transcription inverse est réalisée avec le kit « Transcriptor » (Roche Applied Science). Un µg d'ARN et 3,2µg de random primer sont incubés, dans un volume final de 13µl, 10 minutes à 65°C. Le mélange est immédiatement refroidi dans la glace. Ensuite 20 µl de mélange réactionnel (Tampon RT 1X, 20Unités d'inhibiteur de d'ARNase ; 1mM de chaque dNTP et 10 Unités de transcriptase inverse transcriptor) sont ajoutés. Le tout est ensuite incubé 10min à 25°C ; 30min à 55°C et 5min à 85°C. Le mélange d'ADNc ainsi obtenu est ensuite dilué au 1/5.

- Cinq dilutions successives au ¼ de l'ADN complémentaire sont réalisées. Pour une efficacité de PCR à 100%, la pente de la droite Ct en fonction du log de la concentration en ADN matrice doit être égale à -3,33. Lorsque toutes ces manipulations préliminaires sont réalisées, on analyse les échantillons d'intérêts. Le mélange réactionnel dans chaque capillaire est composé de 5 µl d'ADNc (25 ng), 2µl de Mix SYBR Green, de 0,5 µl d'amorces sens et antisens à 10 µM (concentration finale de 500nM), et de 2,5 µl d'eau « RNase-free ». Les cycles d'élongation sont débutés par une période de dénaturation de 10 minutes à 95°C suivi de 40 cycles de 10 sec à 95°C, 10 sec à 70°C, (taille de l'amplicon/25) secondes à 72°C. Un gène calibrateur est utilisé en parallèle. Ce gène dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes situations biologiques permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADN dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression.

Le taux d'expression du gène d'intérêt est déterminé par rapport à ce gène calibrateur.

4.2 PCR Taqman

- La réaction de transcriptase inverse est réalisée avec le kit High Capacity ADNc Archive kit (Applied Biosystems).

Deux μg d'ARN totaux sont dilués dans $25\mu\text{l}$ d'eau « RNase free ». A ces ARN sont ajoutés $5\mu\text{l}$ de tampon de RT (5X), $2\mu\text{l}$ de dNTP (25X), $5\mu\text{l}$ de random primers (10X) et 125 Unités de transcriptase inverse Multiscribe.

Le mélange réactionnel d'un volume final de $50\mu\text{l}$ est incubé 10min à 25°C puis 2 heures à 37°C .

- Les réactions de PCR TaqMan® a été réalisée sur l'ABI PRISM 7900HT avec les kits TaqMan Universal PCR master mix no Emperase UNG et TaqMan Universal PCR master mix Emperase UNG. Le Mix de PCR (2X) est ajouté à l'ADNc de chaque échantillon et le mélange contient alors $1,5\text{ng}/\mu\text{l}$ d'ADNc. Le volume de PCR de chaque cupule étant d'environ $1\mu\text{l}$, la réaction de PCR s'effectue avec $1,5\text{ng}$ d'ADNc.

La réaction de PCR démarre par une étape d'activation de l'UNG 2 min à 50°C , suivie de 10 minutes à 95°C pour activer l'enzyme de PCR. Ensuite, 40 cycles d'amplification : 30 secondes à 97°C puis 1minute à $59,7^{\circ}\text{C}$.

5 Analyse par cytométrie de flux

Les analyses ont été réalisées sur un appareil Beckman Coulter (Bectin-Dickinson) équipé d'un laser argon (488 nm). Pour ce faire, les cellules sont trypsinisées avec de la trypsine-EDTA (Gibco BRL). Le nombre de cellules par ml est compté puis 5.10^5 cellules sont lavées et utilisées pour le marquage.

