



HAL
open science

Régulation de la gamma-glutamyltransférase humaine et effet de sa surexpression sur la cytotoxicité des anticancéreux dérivés du platine

Sandrine Daubeuf

► **To cite this version:**

Sandrine Daubeuf. Régulation de la gamma-glutamyltransférase humaine et effet de sa surexpression sur la cytotoxicité des anticancéreux dérivés du platine. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN12509 . tel-01754393

HAL Id: tel-01754393

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754393>

Submitted on 30 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

2002

ECOLE DOCTORALE «BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT»

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 Novembre 2002

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

Mention Sciences du Médicament

Par Sandrine DAUBEUF

Née le 03 Septembre 1976

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

«Microbiologie-Enzymologie-Nutrition»



12 12035

REGULATION DE LA GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE HUMAINE ET EFFET DE SA SUREXPRESSION SUR LA CYTOTOXICITE DES ANTICANCEREUX DERIVES DU PLATINE.

MEMBRES DU JURY :

Juges : Marie-Madeleine GALTEAU, Professeur (Nancy, France)
Athanase VISVIKIS, Docteur (Nancy, France)
Marc DIEDERICH, Docteur (Luxembourg)
Jean-Yves JOUZEAU, Docteur (Nancy, France)

Rapporteurs : Chantal TRENTESAUX, Professeur (Reims, France)
Jacques PIETTE, Professeur (Liège, Belgique)



Ce travail a été réalisé à
la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Université Henri Poincaré-Nancy I

Au Laboratoire Thiols et Fonctions Cellulaires (responsable Professeur Pierre Leroy)

Sous la responsabilité conjointe du Dr A. VISVIKIS et du Pr M.M. GALTEAU

Grâce au soutien financier de la Ligue Contre Le Cancer

Il est étrange que la science, qui jadis semblait inoffensive se soit transformée en un cauchemar faisant trembler tout le monde

Albert EINSTEIN

A Athanase sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est

Remerciements :

Par ces quelques lignes je tiens à remercier chacun de ceux qui ont participé (de près ou de loin) à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie Mme le Professeur Chantale Trentesaux et Mr le Professeur Jacques Piette d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et de lui avoir consacré une partie de leur temps. J'espère que ce travail saura éveiller leur intérêt.

Merci à Melle le Professeur Marie Madeleine Galteau pour avoir pris la direction de ma thèse.

Je remercie également mes « Juges », le Docteur Marc Diederich, et le Docteur Jean-Yves Jouzeau pour leur présence dans le jury. Soyez impartiaux mais justes.

J'adresse mes sincères remerciements à Athanase Visvikis, pour la confiance qu'il m'a accordée, sa patience, son soutien moral et pour sa passion pour son métier.

Mon travail a également été appuyé par des équipes extérieures, et je tiens à remercier ceux qui m'ont « hébergée » dans leurs laboratoires : le professeur Aldo Paolicchi (je n'oublierai pas les pauses café italiennes) pour son accueil chaleureux, le Docteur Marc Diederich et son équipe (sans qui les gels retards ne seraient pas au programme de cette thèse) et le Docteur André Pawlack pour son aide précieuse et ses conseils concernant l'étude des promoteurs. J'ai beaucoup apprécié mes séjours au sein de vos équipes.

La majeure partie de ce travail à été réalisée au laboratoire « Thiols et Fonctions cellulaires » dont le directeur, le Professeur Pierre Leroy mérite aussi des remerciements : pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir

fait confiance et également pour son aide très précieuse en ce qui concerne les techniques de CLHP...

Au sein de ce laboratoire, j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont permis que ma thèse se déroule le mieux possible.

J'ai eu l'occasion de travailler avec des étudiants en stage qui m'ont beaucoup apporté, j'ai aimé leur apprendre et j'espère leur avoir communiqué un peu de mon enthousiasme pour la recherche... Marie, Claire, Diane, Sara et Maxime vous avez tous posé quelques pierres dans l'édifice !!! alors merci.

Sans la Ligue Contre le Cancer, je ne serai sans doute pas là aujourd'hui, en tout cas, son soutien financier a été indispensable. J'adresse un grand merci à tous les donateurs anonymes (énormément de personnes ont contribué à ce travail...).

Il ne suffit pas d'avoir un toit et des pipettes pour travailler, le soutien de ma famille et de mes amis a été primordial. Je veux remercier mes parents pour leur amour et leur confiance sans faille, ils n'ont jamais douté de moi et constituent cet appui solide dont chacun a besoin pour avancer.

Mes amis aussi, chacun à votre manière vous remplissez ma vie. A ceux de l'IUT de Tours : et surtout à Olivier pour être toujours à mes côtés, pour me connaître si bien et accepter mes défauts ... (oups) et à Anne parce que c'est elle tout simplement. Une petite pensée pour Gob, Francky et Tony car les amitiés fidèles sont rares.

A Annelyse et Anne, compagnes de l'université et surtout amies, vous m'avez aidé à surmonter bien des choses et je compte sur vous pour la suite...

A Diane qui est arrivée un peu tard au labo mais qui a rendu cette fin de thèse bien plus agréable...

Merci de tout mon cœur Athanase, pour tout ce que tu as fait pour moi.

Table des matières-----	P. 1
Liste des publications	P. 3
Liste des abréviations	P. 4
Index des Figures et Tableaux	P. 6
MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE -----	P. 9
1. Le glutathion -----	P. 10
1.1 Structure-généralités	P. 10
1.2 Le cycle du glutathion : cycle de Meister	P. 11
1.3 Rôles physiologiques du glutathion	P. 14
2. La gamma-glutamyl transferase -----	P. 19
2.1 Structure de la GGT :	P. 19
2.2 Réactions catalysées par la GGT	P. 21
2.3 Rôles physiologiques de la GGT	P. 25
2.4 Historique des travaux sur les gènes de la GGT humaine	P. 27
2.5 Connaissances actuelles sur l'organisation génomique de la GGT	P. 31
2.6 Structure du gène I de la GGT humaine	P. 34
2.7 Comparaison de l'organisation du gène I de la GGT humaine avec celui du rat et de la souris	P. 39
2.8 Régulation de l'expression de la GGT	P. 42
2.9 Régulation et rôle de la GGT lors de la cancérogénèse	P. 47
3. Place du GSH et de la GGT dans la résistance aux traitements anticancéreux par les dérivés du platine -----	P. 49
3.1 Principe de traitement de la pathologie cancéreuse	P. 49
3.2 Le cisplatine, Cis diammine dichloroplatine, CDDP	P. 50
3.3 Le carboplatine	P. 52
3.4 Les mécanismes de résistance aux dérivés du platine	P. 55
OBJECTIFS -----	P. 66
MATERIEL ET METHODES -----	P. 70
Section 1 : Biologie cellulaire	P. 71
1.1 Lignées cellulaires	P. 71
1.2 Milieux de culture	P. 71
1.3 Congélations et décongélations	P. 72
1.4 Transfection transitoire des cellules	P. 72
1.5 Etablissement d'une lignée stable	P. 73
1.6 Mesure de la cytotoxicité par le test MTT	P. 74
Section 2 : Biologie moléculaire	P. 75
2.1 Vecteurs utilisés	P. 75
2.2 Construction de vecteurs recombinants	P. 77
2.3 Minipréparation d'ADN plasmidique	P. 78
2.4 Maxipréparation d'ADN plasmidique	P. 79
2.5 Extraction des ARN totaux	P. 80
2.6 Techniques d'amplification	P. 81
2.7 Amplification rapide des extrémités d'ADNc (Race PCR)	P. 84
2.8 Southern blot	P. 87



2.9 Préparation d'extraits nucléaires	P. 89
2.10 Expériences de retardement sur gel	P. 90
Section 3 : Mesures biologiques	P. 92
3.1 Dosage des protéines	P. 92
3.2 Dosage de l'activité GGT	P. 92
3.3 Dosage du glutathion réduit intracellulaire	P. 92
3.4 Dosage du GSH et de la CysGly extracellulaire	P. 93
3.5 Dosage de l'activité γ GCS	P. 94
3.6 Dosage de la production d'espèce réactives de l'oxygène	P. 95
3.7 Mesure de la formation des adduits Thiols-Cisplatine	P. 97
3.8 Dosage des activités luciférase	P. 98
Analyses statistiques des résultats expérimentaux et annexes techniques	P. 99
RESULTATS/DISCUSSION-----	P. 101
Partie I Régulation de l'expression de la GGT humaine-----	P. 102
1.1 Etude de la modulation de l'expression de la GGT dans 4 lignées cellulaires	P. 102
1.2 Recherche du promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm de sous type C	P. 113
1.3 Etudes fonctionnelles des promoteurs B et C de la GGT humaines	P. 123
Discussion 1ère partie-----	P. 135
Article 1-----	P. 148
Partie II Rôle de la GGT dans la réponse cellulaire au CDDP et au carboplatine-----	P. 149
2.1 Régulation de la GGT par les dérivés du platine	P. 150
2.2 Régulation du taux de GSH intracellulaire par les dérivés du platine	P. 154
2.3 Etablissement et caractérisation de la lignée HeLa-GGT	P. 155
2.4 Influence de l'activité GGT sur le GSH intracellulaire	P. 156
2.5 Rôle de la GGT dans la résistance cellulaire au CDDP et au carboplatine	P. 160
Discussion 2^{ème} partie-----	P. 172
Article 2-----	P. 183
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES-----	P. 184
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES-----	P. 193

Les travaux présentés dans cette thèse ont fait l'objet de deux publications et de 3 présentations affichées lors de congrès :

PUBLICATIONS :

- Daubeuf S, Accaoui MJ, Pettersen I, Huseby NE, Visvikis A, Galteau MM (2001). Differential regulation of gamma-glutamyltransferase mRNAs in four human tumour cell lines. *Biochim Biophys Acta*. **1568**, 67-73.
- Daubeuf S, Leroy P, Paolicchi A, Pompella A, Wellman M, Galteau MM, Visvikis A (2002). Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase. *Biochem Pharmacol*; **64**, 207-16.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES :

- «Regulation of human gamma-glutamyltransferase mRNA by TPA»
Forum des jeunes chercheurs Septembre 2001 Strasbourg.
- «Overexpression of gamma-glutamyltransferase enhances the resistance of HeLa cells to cisplatine»
Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions - New Evidence, Insights and Speculation
Novembre 2001 Pisa.
- «Differential regulation of human gamma-glutamyltransferase mRNA in four human cell lines»
Cell signaling, transcription and translation as therapeutic targets, Février 2002 Luxembourg.

LISTE DES ABREVIATIONS :

3'NT : région 3' non traduite

5'NT : région 5' non traduite

ADN : acide déoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AP1 : activator protein 1

ARE : site de réponse aux antioxydants

ARNm : acide ribonucléique messenger

BSO : buthionine sulfoximine

CBP : protéine de liaison au CRE (CRE binding protein)

CDDP : cis-diamminedichloroplatinum (II)

CLHP : chromatographie liquide de haute performance

CRE : élément de réponse à l'AMPc (cAMP responsive element)

Cys : cystéine

CysGly : Cystéinyglycine

CysGly-CDDP : adduit formé entre la CysGly et le CDDP

DNTP : déoxynucléotide triphosphate

DTT : dithiothréitol

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ERK : extracellular signal regulated kinase

ERO : espèces réactives de l'oxygène

γ GCS : gamma-glutamylcystéine synthétase

GGT : gamma-glutamyl transférase

Glygly : glycyglycine

GPx : glutathion peroxydase

GR : glutathion reductase

GSH : glutathion réduit

GSH-CDDP : adduit formé entre le GSH et le CDDP

GSSG : glutathion oxydé

GSTP1 : glutathion S transférase P1

JNK : Jun-NH₂ terminal kinase

Kb : kilobase

KDa : kilo Dalton

MDR : multidrug resistance

NFkB : facteur nucléaire kB

Pb : paire de bases

PBS : tampon phosphate salin

PCR : amplification en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)

TNF : tumor necrosis factor

TPA : phorbol 12-myristate 13-acétate

TRE : élément de réponse au TPA (TPA responsive element)

LISTE DES FIGURES:

INTRODUCTION

- P. 10 Figure 1 : Structure du glutation (GSH)
- P.10 Figure 2 : Structure du glutathion oxydé (GSSG)
- P. 11 Figure 3 : Cycle du GSH selon Meister
- P. 13 Figure 4 : Le cycle des réactions glutathion-peroxydase ; glutathion-réductase
- P. 15 Figure 5 : Réactions du glutathion avec les espèces radicalaires
- P. 16 Figure 6: Mécanisme d'activation de la transcription des gènes par AP1 et NFκB
- P. 19 Figure 7 : Structure de la GGT
- P. 21 Figure 8 : Réactions catalysées par la GGT
- P. 23 Figure 9: Origine du stress oxydant dépendant de la GGT
- P. 32 Figure 10 : Organisation génomique de la GGT humaine
- P. 34 Figure 11 : Structure de la région codante du gène de type I de la GGT humaine
- P. 35 Figure 12 : Structure de la région 5' du gène de la GGT humaine
- P. 37 Figure 13 : Structure de la région 5' non traduite du gène I de la GGT et événement d'épissage aboutissant aux 3 sous types A, B et C de messagers
- P. 40 Figure 14 : Comparaison de l'organisation des régions 5' non traduites du gène de la GGT de différentes espèces
- P. 53 Figure 15 : Mécanismes d'action du CDDP
- P. 54 Figure 16 : Structure des différents adduits CDDP-ADN
- P. 55 Figure 17 : Mécanismes de résistance au CDDP

MATERIEL ET METHODES :

- P. 86 Figure 18 : Principe de la 5' RACE
- P. 96 Figure 19 : Oxydation de la DHR-123 en Rh-123

RESULTATS ET DISCUSSION :

- P. 103 Figure 20 : Démarche expérimentale pour l'étude de la régulation de la GGT humaine.
- P. 105 Figure 21 : Modulation du taux d'ARNm total de la GGT
- P. 108 Figure 22 : Modulation du taux de chaque sous types de messagers
- P. 114 Figure 23 : Recherche et caractérisation du promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm de sous type C de la GGT : Démarche expérimentale
- P. 115 Figure 24 : Région 5' non traduite de l'ARNm de sous type C, choix des amorces pour la 5' RACE et de la sonde pour le southern blot

- P. 116 Figure 25 : Résultats de la 5' RACE
- P. 117 Figure 26 : Southern blot sur les produits de 5' RACE clonés dans le pCR-4 Topo digéré par EcoRI
- P. 118 Figure 27 : Résultat du séquençage des 2 clones
- P. 119 Figure 28 : Séquence partielle du promoteur contrôlant la transcription des ARNm GGT I_c
- P. 121 Figure 29 : Activités promotrices des fragments pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆ dans la lignée cellulaire HeLa
- P. 124 Figure 30 : Séquence partielle du promoteur B
- P. 124 Figure 31: Représentation des sites AP-1 sur la séquence promotrice contrôlant la transcription des ARNm GGT I_B
- P. 125 Figure 32 : Fragments utilisés pour la construction des différents vecteurs reporteurs.
- P. 126 Figure 33 : Activités promotrices des différents fragments du promoteur B
- P. 128 Figure 34 : Etude de la fixation des facteurs nucléaires aux sites potentiels ARE et AP1-I.
- P. 129 Figure 35 : Mise en évidence de la fixation du facteur de transcription AP1 sur le site AP1-II
- P. 131 Figure 36 : Etude de la composition du facteur AP1 par supershift avec l'anticorps dirigé contre c-Jun
- P. 132 Figure 37 : Modulation des activités promotrices des fragments pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆
- P. 151 Figure 38 : Modulation de l'activité GGT par le CDDP dans les cellules HeLa
- P. 152 Figure 39 : Modulation du taux de l'ARNm I_T par le CDDP dans les cellules HeLa
- P. 153 Figure 40 : Modulation du taux des ARNm I_A et I_C par le CDDP dans les cellules HeLa
- P. 154 Figure 41 : Modulation de l'activité GGT par le carboplatine dans les cellules HeLa
- P. 155 Figure 42 : GSH intracellulaire dans la lignée HeLa
- P. 159 Figure 43 : Métabolisme du GSH extracellulaire et accumulation de la CysGly dans le milieu extracellulaire par les cellules HeLa et HeLa-GGT
- P. 161 Figure 44 : Cytotoxicité du CDDP
- P. 162 Figure 45 : Cytotoxicité du carboplatine
- P. 163 Figure 46 : Influence du taux de GSH extracellulaire sur la cytotoxicité du carboplatine
- P. 165 Figure 47 : Mesure de la production d'ERO par les lignées HeLa et HeLa-GGT
- P. 166 Figure 48 : Cinétique d'apparition des adduits GSH-CDDP et CysGly-CDDP

P. 168 Figure 49 : Apparition de l'adduit CysGly-CDDP- en présence de GGT purifiée

P. 170 Figure 50 : Formation de l'adduit CysGly-CDDP- dans le milieu extracellulaire

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :

P. 187 Figure 51 : Mécanisme proposé pour la régulation du promoteur B par le TPA dans les deux lignées cellulaires HeLa et HepG2

P. 192 Figure 52 : Mécanisme hypothétique illustrant le rôle de la GGT dans la résistance au CDDP et au carboplatine.

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION :

P. 27 Tableau I : Historique des travaux sur les gènes de la GGT humaine.

MATERIEL ET METHODE :

P. 78 Tableau II : Amorces utilisées pour la construction des vecteurs pGGT C_{.489} et pGGT C_.

856

P. 82 Tableau III : liste des amorces utilisées pour les PCR

P. 88 Tableau IV : Liste des sondes utilisées pour les southern blot

P. 90 Tableau V : sondes utilisées pour les expérience de retardement sur gel

RESULTATS :

P. 104 Tableau VI : Effets du TNF α , TPA et NaBu sur l'activité GGT

P. 109 Tableau VII : Modulation du taux de chaque sous types : résultats des quantifications

P. 125 Tableau VIII : comparaison des sites potentiels aux séquences consensus

P. 146 Tableau IX : Séquence des sites «TFIID binding» des promoteurs C humains et P3 de rat

DISCUSSION :

P. 157 Tableau X : Concentration en GSH intracellulaire des cellules HeLa et HeLa-GGT en fonction des conditions de culture

**MISE AU POINT
BIBLIOGRAPHIQUE**

1.2. Le cycle du glutathion : cycle de Meister

La synthèse et la dégradation du GSH (Meister *et al*, 1983) sont régulées par 6 réactions enzymatiques constituant le cycle γ -glutamyle ou cycle de Meister (Figure 3).

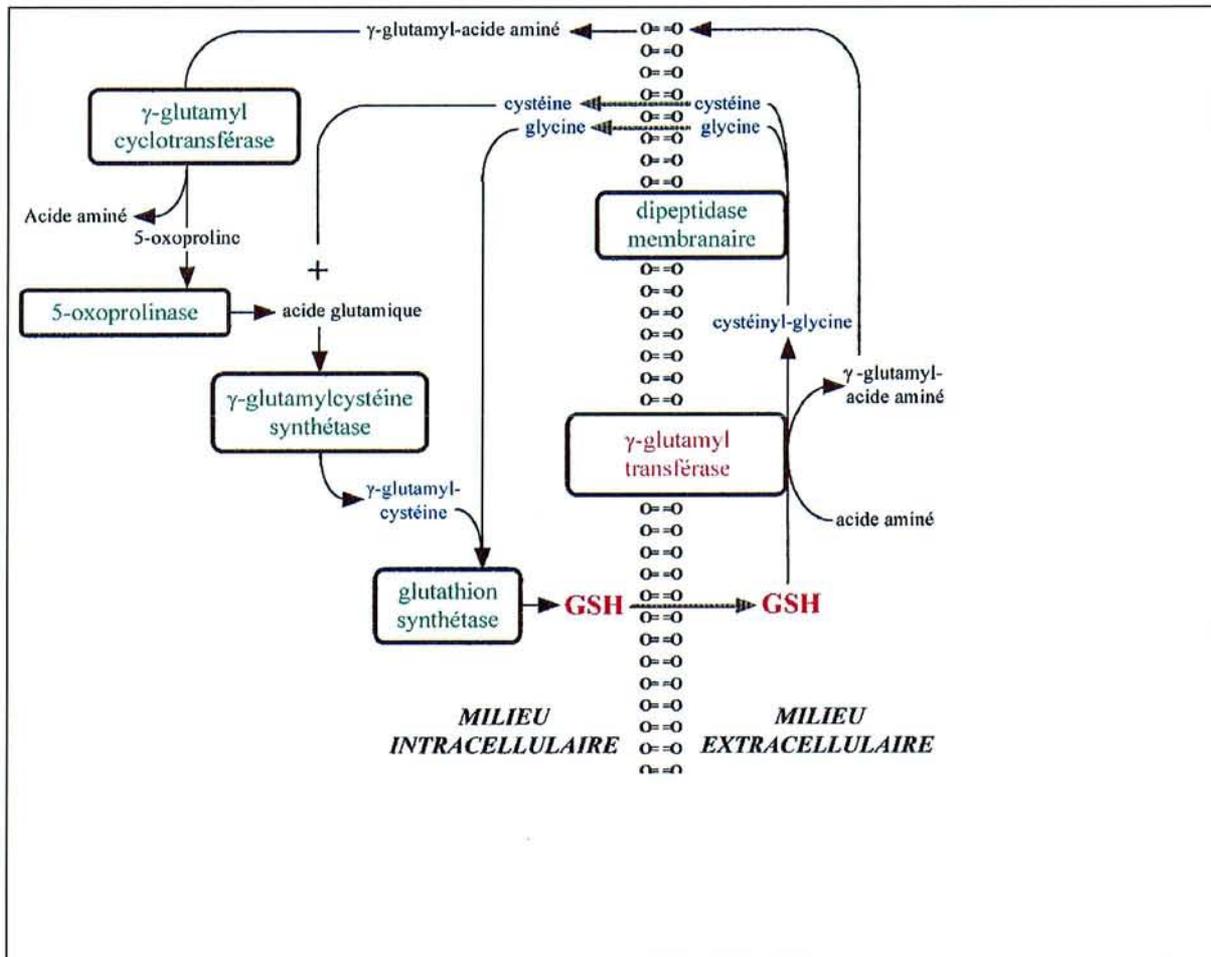


Figure 3 : Cycle du GSH selon Meister.

1.2.1. Biosynthèse du GSH :

La synthèse du GSH intracellulaire requiert la présence de 2 enzymes et de 3 acides aminés : la glycine, le glutamate et la cystéine, cette dernière étant le substrat limitant de la réaction. Le GSH est synthétisé par l'action consécutive de 2 enzymes : la γ -glutamylcystéine synthétase (γ GCS, EC 6.3.2.2) et la glutathion synthétase (EC 6.3.2.3). En général, l'activité γ GCS détermine le taux de synthèse du GSH ; elle catalyse la formation du dipeptide γ -glutamylcystéine

(GluCys) à partir du glutamate et la cystéine. Cette réaction est inhibée par un rétro contrôle négatif du GSH sur la γ GCS. La γ GCS est une enzyme hétérodimérique constituée d'une sous unité lourde de 73 kDa contenant le site catalytique et d'une sous unité légère de 30 kDa ayant une activité régulatrice. L'activité régulatrice de la sous unité légère serait médiée par un pont disulfure entre les 2 sous unités qui permettrait des changements conformationnels du site actif en fonction de l'état redox de la cellule (Huang *et al* 1993).

La glutathion synthétase quant à elle, catalyse la fixation d'une molécule de glycine sur la GluCys. La régulation de la synthèse intracellulaire du GSH est soumise au moins à trois facteurs : (i) le niveau d'expression de la γ GCS dans la cellule ; (ii) la disponibilité des substrats, en particulier de la cystéine (acide aminé limitant) et (iii) le rétro-contrôle négatif de la γ GCS par le GSH.

1.2.2. Dégradation du GSH

La dégradation du GSH extracellulaire est initiée par la γ -glutamyltransferase (GGT, EC 2.3.2.2), seule enzyme capable de cliver la liaison γ -glutamyle du tripeptide. Cette réaction libère le résidu γ -glutamyle et le dipeptide cystéinyglycine (CysGly).

La CysGly produite peut être clivée par une dipeptidase membranaire en cystéine (cys) et glycine (gly). Ces acides aminés peuvent alors être transportés activement dans la cellule et servir pour la synthèse *de novo* du GSH.

Le résidu γ -glutamyle est transféré sur un acide aminé accepteur ce qui conduit à un γ -glutamyl-acide aminé pouvant être transporté dans la cellule puis transformé par la γ -glutamylcyclotransférase en l'acide aminé correspondant et en 5-oxoproline. La 5-oxoproline sous l'action de la 5-oxoprolinase (EC 3.5.2) est décyclisée et donne l'acide glutamique.

Ainsi, l'initiation de la dégradation du GSH à l'extérieur de la cellule par la GGT est nécessaire pour sa synthèse intracellulaire de novo car elle fournit à la cellule les éléments précurseurs.

1.2.3. Transport et devenir du GSH

Une fois synthétisé (majoritairement dans le foie), le GSH peut être exporté vers des organes comme le rein ou l'intestin où il joue un rôle primordial. L'exportation du GSH va

également servir de système transporteur d'acides aminés et de système cyclique de récupération de la cystéine. Ce processus est d'une importance majeure car la synthèse du GSH est dépendante de l'apport extracellulaire de cystéine, (sauf dans le foie qui est capable de synthétiser la cystéine à partir du squelette carboné de la méthionine).

1.2.4. Cycle d'oxydo-réduction du GSH

Le maintien de l'équilibre GSH/GSSG est primordial pour le déroulement normal des fonctions cellulaires. Il est assuré par 2 enzymes : la glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2), et la glutathion peroxydase (GPx, EC 1.11.1.3) (Figure 4)

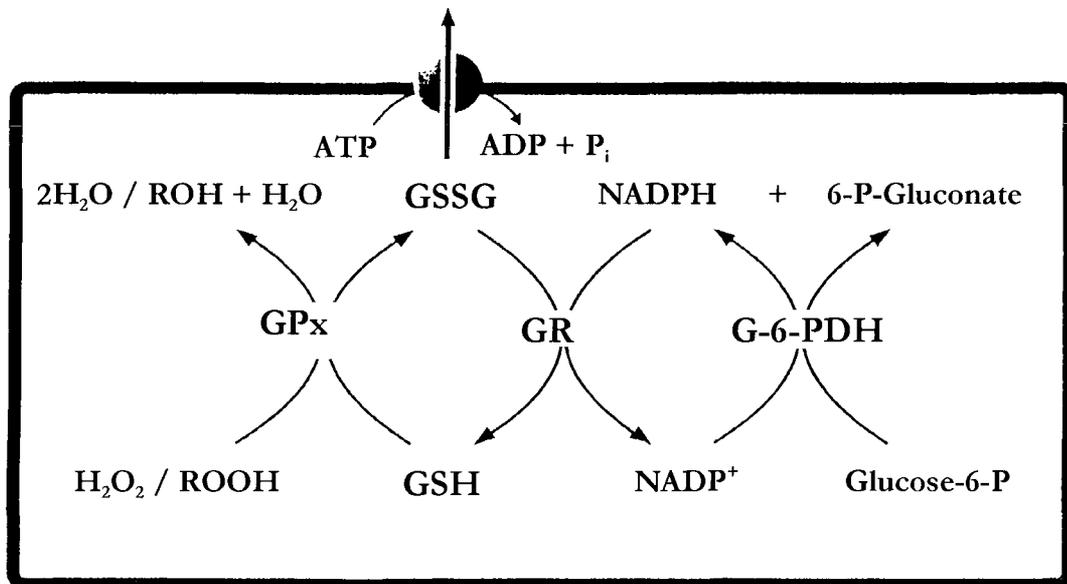


Figure 4 : Le cycle des réactions glutathion-peroxydase / glutathion-réductase. GPx : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, G-6-PDH : glucose-6-phosphate-déshydrogénase

La GPx fait partie d'une famille de sélénoprotéines qui réduisent le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et les peroxydes organiques en alcools aux dépens du GSH. Les isoenzymes de la GPx diffèrent par leur distribution et leurs rôles tissulaires particuliers ainsi que par la spécificité de leur substrat.

L'activité de la GPx nécessite le recyclage du GSH par coopération de plusieurs systèmes enzymatiques, dont la GR, qui réduit le GSSG en consommant du NADPH. Ce dernier est

régénéré par l'action de la glucose-6-phosphate-déshydrogénase dans le cycle des pentoses-phosphate, source de NADPH.

Les réactions qui consomment le GSH produisent du GSSG qui est soit reconverti en GSH soit excrété à l'extérieur de la cellule. Dans des conditions physiologiques, l'activité de la GR et la disponibilité en NADPH sont suffisantes pour maintenir le rapport $[GSH]/[GSSG] > 100$.

1.3. Rôles physiologiques du glutathion

Le GSH en tant que “réservoir de cystéine”, participe à la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Il intervient également dans la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines et joue un rôle important dans le métabolisme des glucides et le transport des acides aminés (Meister *et al*, 1986). Mais ses principales fonctions concernent les processus d'oxydoréduction.

1.3.1. Rôle de protection contre le stress oxydant

Le rôle du GSH dans la défense antioxydante est bien établi dans de très nombreuses études *in vitro* et *in vivo* : par exemple, il a été montré que le GSH inhibe la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines dans les microsomes (Palamanda and Kehrer, 1992), la production du radical hydroxyle (OH^\bullet) par la réaction de Fenton et l'oxydation de l'ADN (Spear and Aust, 1995) et que sa concentration dans les macrophages est inversement corrélée à la capacité de ces cellules d'oxyder les LDL (Low Density Lipoprotein) (Rosenblat et Aviram, 1998). Grâce à sa concentration élevée, le GSH est l'antioxydant majeur de la cellule par un mécanisme de piègeur direct des espèces réactives et par sa fonction de substrat pour d'importantes enzymes de défense. Il possède en effet des propriétés réductrices et nucléophiles et est un piègeur efficace du radical OH^\bullet ainsi que d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote variées (Kalyanaraman *et al*, 1996). Il intervient alors comme donneur soit d'hydrogène, soit d'électrons (sous sa forme ionisée GS⁻).

En réagissant avec différentes espèces radicalaires, le GSH forme le radical glutathionyle (GS[•]), espèce radicalaire peu réactive qui est inactivée par dimérisation (formation de GSSG) ou par réaction avec l'anion GS⁻. Dans ce dernier cas, il se forme l'anion radical GSSG^{•-} qui, en présence

d'oxygène, produit du GSSG et de l'anion superoxyde. Ainsi, le radical GS^\bullet peut initier des réactions de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont l'inactivation nécessite l'intervention d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD) (Munday et Winterbourn, 1989) (Figure 5). De cette façon, bien que la majorité des fonctions du GSH vis-à-vis du stress oxydant soient protectrices, la possibilité de certaines réactions secondaires prooxydantes ne doit pas être exclue.

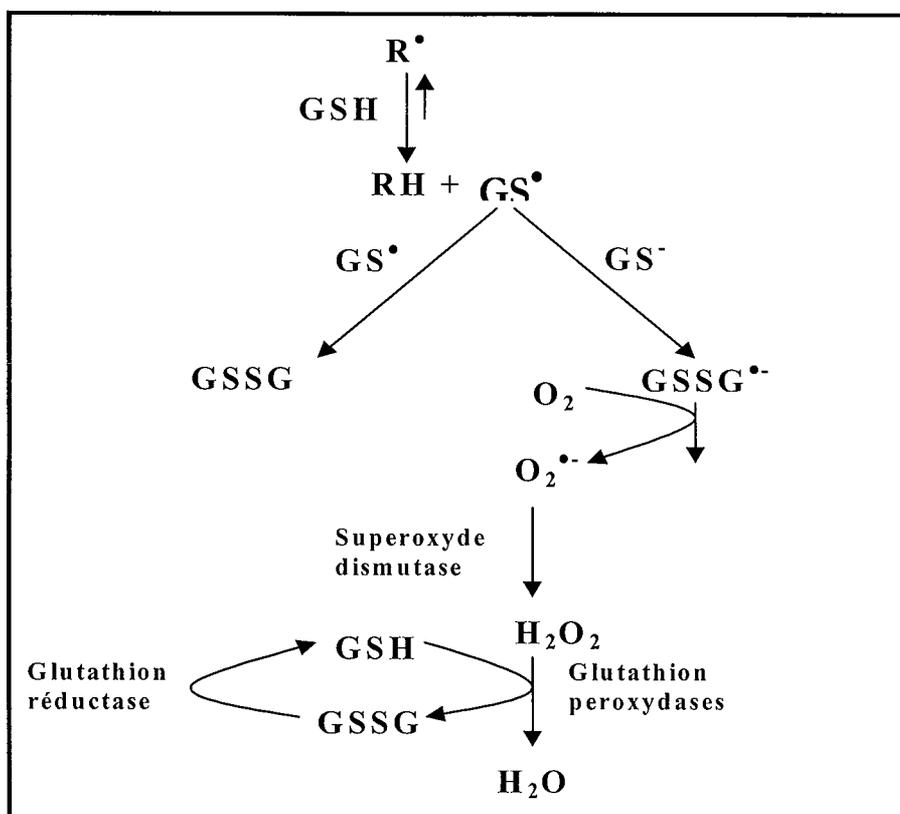


Figure 5 : Réactions du glutathion avec les espèces radicalaires.

1.3.2. GSH et facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont composés le plus souvent de 2 sous unités, l'une reconnaissant un site spécifique sur l'ADN, et l'autre servant d'effecteur et modulant l'expression des gènes cibles. Ainsi, le facteur AP1 est principalement constitué des produits des gènes *Jun* et *Fos* qui vont s'associer pour former l'homodimère (Jun/Jun), ou l'hétérodimère (Jun/Fos). Ce facteur est induit par de très nombreux stimuli (facteurs de croissance, cytokines, neurotransmetteurs, radiations UV par exemple) et intervient de façon rapide et fine lors d'un

stress oxydant. Klatt *et al* (1999) ont démontré que la fixation de c-Jun à l'ADN est régulée par le ratio GSH/GSSG : une forte concentration en GSSG inhibe la fixation de AP1 à l'ADN. En fait, le maintien à l'état réduit de la cystéine du site de fixation à l'ADN est nécessaire à la liaison du facteur sur son site consensus et cette liaison est directement régulée par le statut redox de la cellule (Figure 6).

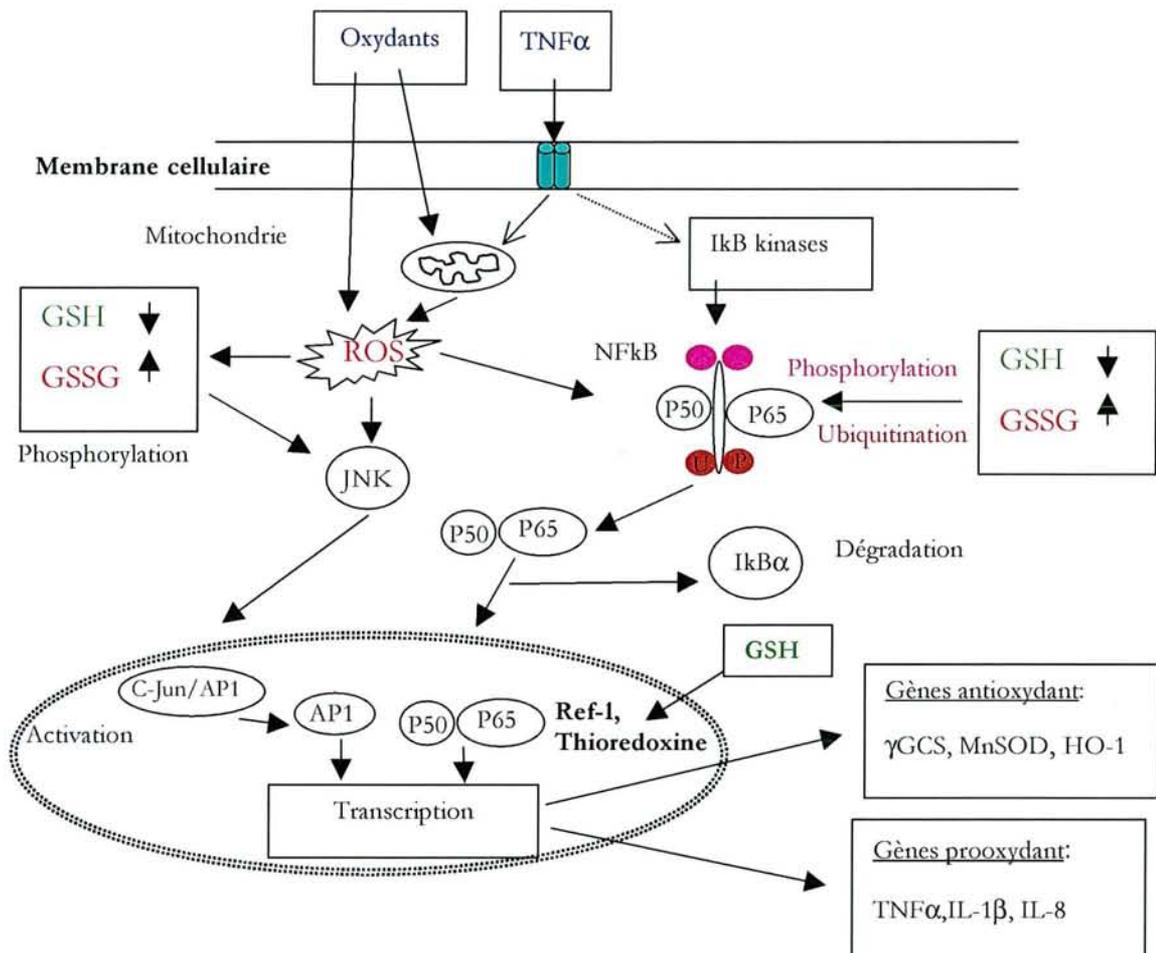


Figure 6 : Mécanisme d'activation de la transcription des gènes par AP1 et NFκB

(d'après Rahman *et al*, 2000) : un stress oxydant, ou le TNFα vont agir sur les mitochondries qui en retour produisent des ERO impliqués dans l'activation des facteurs AP1 et NFκB. L'activation de NFκB implique la phosphorylation et l'ubiquitination de son inhibiteur cytoplasmique IκB qui est alors dégradé. La protéine NFκB libre peut ensuite être transloquée dans le noyau et se lier à son site consensus. Le ratio intracellulaire GSH/GSSG et la présence de Ref-1 et de thioredoxine peuvent moduler l'activation de NFκB ou AP1. De même, le facteur de transcription AP1 (cJun/cJun ou cFos/cJun) est activé suite à la phosphorylation de la JNK et va se fixer sur le site consensus TRE. L'activation des facteurs AP1 et NFκB conduit à l'expression coordonnée de gènes anti ou prooxydants.

Le facteur de transcription NFκB est un membre de la famille des protéines régulatrices Rel. Il est lui aussi induit par les ERO et contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans les

processus de défense cellulaire et dans la réponse immune. Il est constitué de 2 sous unités (P50 et P65) qui se trouvent à l'état inactif couplées à des inhibiteurs dans le cytoplasme. Lors de l'activation du facteur NFκB, les sous unités qui le composent sont libérées de leur inhibiteur lorsque celui-ci est phosphorylé par une tyrosine kinase activée par le stress oxydant, les esters de phorbol, H₂O₂, les UV, les rayons γ ou par des cytokines inflammatoires. En tant que piègeur de radicaux libre, le GSH est directement impliqué dans la modulation de l'activation du facteur NFκB : en effet, en présence d'une forte concentration de GSH intracellulaire, ou quand de la cystéine est fournie aux cellules, cela inhibe l'induction de NFκB par plusieurs agents oxydants (Mihm *et al*, 1995). Ainsi, la concentration intracellulaire en GSH ainsi que son statut redox vont intervenir de façon directe dans la modulation de l'expression de certains gènes, notamment ceux impliqués dans la réponse cellulaire au stress oxydant. Cependant, l'effet des ERO sur la transduction du signal est dépendant de la lignée cellulaire.

1.3.3. Rôle du GSH dans l'apoptose

Beaucoup des changements morphologiques associés à l'apoptose sont régulés par des protéases spécifiques appelées caspases. Les mitochondries joueraient un rôle important dans l'activation de ces caspases, car un dysfonctionnement dans la membrane mitochondriale est un événement clé dans le déclenchement de l'apoptose. Les altérations de la membrane mitochondriale sont souvent liées à l'état redox de la cellule, et donc au ratio GSH/GSSG. Une diminution du taux de GSH intracellulaire est l'un des premiers phénomènes observés lors de l'apoptose et pourrait être une des causes de la mort cellulaire. Cette déplétion accompagne la production d'ERO pendant l'apoptose (Tan *et al*, 1998). La diminution du GSH intracellulaire observée lors de l'apoptose induite par Ras est due à une augmentation de l'efflux extracellulaire. Cet efflux est bloqué par la bromosulfoptaléine (BSP) qui agit sur les transporteurs membranaires du GSH présents dans la plupart des lignées cellulaires (Van den Dobbelsteen *et al*, 1996).

La redistribution du GSH intracellulaire est un autre événement critique lors de l'apoptose. Bien qu'il soit synthétisé dans le cytosol, il est transporté dans les organelles comme les mitochondries et le noyau. Le BSO (Buthionine sulphoximine) est un inhibiteur de la voie de biosynthèse du GSH qui agit comme inhibiteur de la γGCS. Le pool nucléaire de GSH est le plus résistant à la déplétion induite par cet agent ce qui suggère l'importance de ce pool particulier (Hall *et al*, 1999).

D'ailleurs, il a été mis en évidence que la surexpression de Bcl-2 (facteur antiapoptotique) résulte en une séquestration du GSH dans le noyau (Voehringer *et al*, 1999), ce qui suggère que l'un des mécanismes de régulation de l'apoptose passe par le statut redox du noyau, dépendant du GSH.

1.3.4. Rôle du GSH dans la détoxification des xénobiotiques

Les glutathion-S-transférases (GST) (EC 2.1.5.18) représentent une vaste famille d'isoenzymes homo-ou hétéro-dimériques qui ont un rôle important de détoxification par conjugaison au GSH de nombreux substrats électrophiles exogènes ou endogènes. Les différentes isoenzymes cytosoliques sont groupées en quatre classes principales en fonction de leurs propriétés structurales, immunologiques et catalytiques : alpha (A), mu (M), pi (P) et théta (T). Dans ces réactions, le GSH réagit avec des substrats électrophiles après la formation d'ions thiolates. La formation des conjugués peut se faire spontanément, mais est catalysée par les GST, probablement via la catalyse de la formation des ions thiolates et leur juxtaposition avec les substrats électrophiles. Les GST sont très spécifiques pour le GSH, mais chaque classe montre une spécificité particulière pour le substrat électrophile. Le composé conjugué au GSH est ensuite exporté hors de la cellule via la pompe GS-X (pompe aux conjugués du GSH) et suivra la voie des acides mercapturiques avant d'être éliminé dans la bile ou les urines.

Le GSH, par ses propriétés chimiques et physiologiques joue un rôle central dans les fonctions cellulaires vitales et aussi dans la défense des cellules contre le stress oxydant et les xénobiotiques. Les enzymes du cycle du GSH sont extrêmement importantes pour la régulation du taux de GSH intracellulaire, ainsi que pour son recyclage redox. La GGT (l'une des enzymes du cycle de Meister), est la seule enzyme capable de cliver la liaison γ -glutamyle du GSH, et donc c'est l'enzyme qui initie sa dégradation extracellulaire et qui permet l'approvisionnement des cellules en cystéine. Le chapitre suivant décrit les fonctions et l'organisation génomique de la GGT humaine.

2. La gamma-glutamyl transferase

2.1. Structure de la GGT

La gamma-glutamyl transferase (GGT ou, 5-glutamyl-peptide-amino-acide-5-glutamyl-transférase EC 2.3.2.2) est une enzyme membranaire dimérique, amphiphile, fortement glycosylée (Meister *et al*, 1981). Elle est composée de 2 chaînes polypeptidiques formant une sous unité lourde et une sous unité légère. Ces 2 sous unités sont issues d'un précurseur qui va subir un clivage protéolytique pour aboutir à la forme mature de la protéine, où elles sont associées par des liaisons non covalentes. Contrairement à la plupart des protéines membranaires qui présentent plusieurs segments transmembranaires du côté carboxy-terminal, la GGT est ancrée à la surface externe des membranes par un seul segment hydrophobe situé à l'extrémité N-terminale de la sous-unité lourde (Matsuda *et al*, 1983 B) (Figure 7).

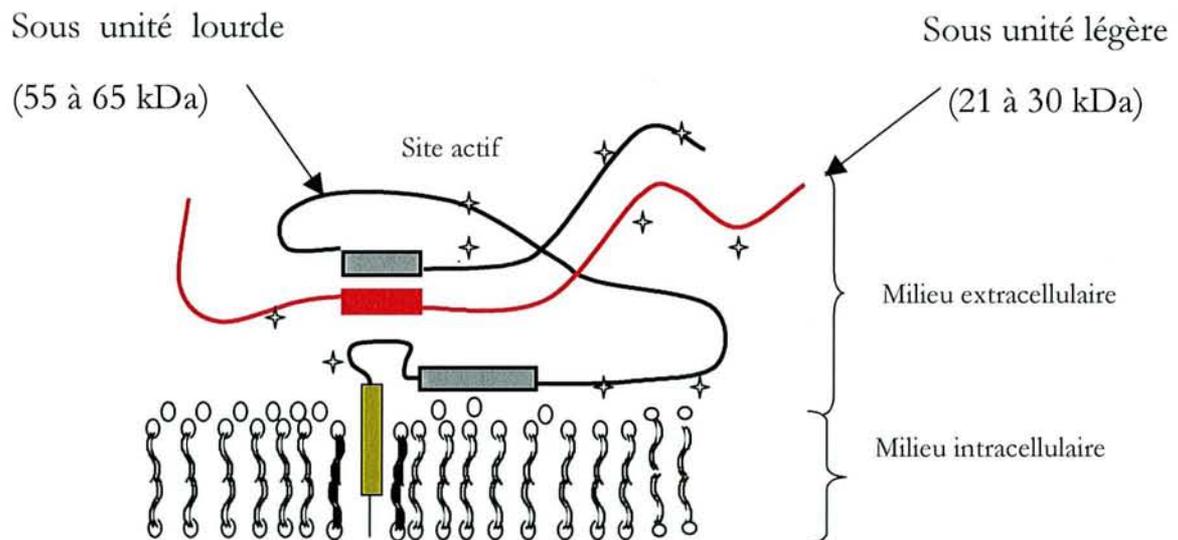


Figure 7 : Structure de la GGT.

La masse moléculaire des sous unités varie selon les espèces et les organes (Selvaraj *et al*, 1985). Dans le foie de l'homme, les masses moléculaires de la sous unité légère et de la sous unité lourde sont respectivement de 28 à 30 kDa, et de 60 à 64 kDa.

Il existe en fait plusieurs isoformes de la GGT différentes par leurs mobilités électrophorétiques. En effet, la GGT de foie humain a la plus grande mobilité électrophorétique, et suivent en ordre décroissant, la GGT pancréatique, rénale et duodénale. Cependant, les propriétés catalytiques des GGT humaines ne diffèrent pas significativement, et elles sont immunologiquement identiques. (Shaw *et al*, 1980). Les différences des masses moléculaires sont en fait dues à la glycosilation.

Le clivage protéolytique du précurseur de la GGT débute dans le réticulum endoplasmique, et l'addition de galactose, de glucose et d'acide sialique se fait dans l'appareil de golgi. La glycosylation de l'enzyme serait un élément déterminant pour son transfert intracellulaire (Barouki *et al*, 1984), mais elle n'est pas nécessaire à la protéolyse spécifique du précurseur (Nash et Tate, 1984). Smith *et al*, 1994 ont démontré que les formes déglycosylées de GGT de foie de rat et de porc montrent les mêmes activités catalytiques que l'enzyme native. Elles sont cependant plus sensibles à l'action des protéases. Une étude sur une lignée d'hépatome de rat a montré qu'un traitement à l'éthanol est responsable d'une modification de la glycosylation de la GGT (Odoul *et al*, 1994). Ainsi, la glycosylation de la GGT sans influencer sur l'activité catalytique de l'enzyme pourrait la protéger et modifier sa demi-vie.

En 1995, Ikeda *et al* font exprimer dans un système baculovirus un mutant de la GGT à qui il manque la séquence pour les acides aminés 1 à 27 de l'extrémité N terminale. Cette protéine est sécrétée dans le milieu extracellulaire suggérant que la séquence délaissée corresponde au signal d'encrage à la membrane. Après purification les auteurs ont démontré que cette enzyme possède les mêmes propriétés catalytiques que la GGT native.

Cependant l'étude de Dvorakova *et al*, (1996) tend à montrer que la structure des chaînes de saccharides peut moduler les paramètres cinétiques de l'enzyme. En effet, 2 isoformes pancréatiques différentes par leur glycosylation montrent des Km de 1,43 mM et 0,67 mM pour le substrat synthétique (L- γ -glutamyl 3-carboxy 4). De même, une étude plus récente a montré une induction de l'activité GGT hépatique chez des rats diabétiques, sans modification de

l'expression de cette enzyme (Cornwell *et al*, 2001). Cette induction serait due à une modification de la glycosylation de la protéine (glycation liée à la forte concentration en glucose sanguin).

2.2. Réactions catalysées par la GGT

La GGT catalyse le transfert du groupement γ -glutamyl (équation 1) d'un composé donneur (tel que le GSH), à différents accepteurs comme des acides aminés, des dipeptides ou le GSH lui-même (équation 2). Quand l'accepteur est une molécule d'eau, il en résulte une hydrolyse de la liaison γ -glutamyl (équation 3), et la formation d'acide glutamique.

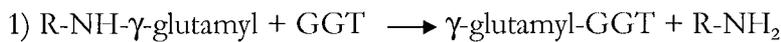


Figure 8 : réactions catalysées par la GGT

Les réactions catalysées par la GGT rendent compte des rôles polyvalents de cette enzyme. En dehors de l'approvisionnement des cellules en précurseurs du GSH, la GGT participe au transport transmembranaire des acides aminés. Le γ -glutamyl-acide aminé formé par transpeptidation pénètre dans la cellule et, sous l'action de la γ -glutamylcyclotransférase, conduit à la formation de 5-oxo-proline et libère l'acide aminé. Ce dernier peut être utilisé pour la synthèse des protéines en fonction des besoins cellulaires et la 5-oxo-proline fournit de l'acide glutamique sous l'action de la 5-oxoprolinase (Figure 3) (Anderson et Meister, 1983).

2.2.1. Place de la GGT dans la balance anti/pro-stress oxydant

Les réactions catalysées par la GGT expliquent le rôle ambivalent de cette enzyme dans la balance anti ou pro oxydant. Elle est en effet impliquée à la fois dans des réactions aboutissant à une

défense contre le stress oxydant (par sa place clé dans la synthèse du GSH), et dans des réactions aboutissant à la production d'ERO.

2.2.1.1. Propriétés antioxydantes de la GGT

Comme nous l'avons vu lors de la description du cycle de Meister, les cellules riches en GGT possèdent un avantage pour leur approvisionnement en cystéine, acide aminé essentiel à la synthèse du GSH. Par ce biais, on peut donc considérer que la GGT fait partie des enzymes de défense contre le stress oxydant. Plusieurs études vont d'ailleurs dans ce sens. Ainsi, Karp *et al* (2001) ont démontré que des cellules Ramos (lymphocytes B humains) transfectées par l'ADNc de la GGT humaine deviennent plus résistantes à la mort cellulaire due aux ERO que la lignée parentale qui n'exprime pas cette enzyme. En fait, ces cellules possèdent un fort avantage pour maintenir leur taux de GSH intracellulaire, et elles présentent un taux d'ERO intracellulaire inférieur à celui des cellules Ramos non transfectées.

L'oxyde nitrique est un puissant oxydant et Moellering *et al* (1999), ont démontré qu'une augmentation significative du taux de GSH intracellulaire est observée lorsque des cellules endothéliales sont traitées par cet agent. En fait, l'oxyde nitrique induit l'activité de la γ GCS, mais ceci n'est pas suffisant, car l'utilisation d'acivicine (inhibiteur spécifique de la GGT) empêche l'augmentation de la synthèse du GSH intracellulaire. D'ailleurs, Meroni *et al* (2000) ont démontré que l'oxyde nitrique induit l'activité de la GGT dans les cellules de Sertoli, ce qui indique bien que cette enzyme est l'une des enzymes de réponse antioxydante dans différents types cellulaires.

2.2.1.2. Origine du stress oxydant GGT-dépendant

Alors que le rôle anti-oxydant de la GGT, (à travers le métabolisme du GSH), a été clairement établi, Stark *et al.* (1993) ont dévoilé un rôle pro-oxydant de la GGT. En effet, le catabolisme du GSH par la GGT, en présence de fer et d'O₂, conduit à la peroxydation lipidique *in vitro*, provoquant alors des dommages oxydatifs.

Cet effet pro-oxydant de la GGT s'explique par la différence de réactivité entre le GSH et son métabolite, la CysGly. En effet, les propriétés réductrices des thiols dépendent de leurs capacités à se retrouver sous forme de thiolate. Or, à pH physiologique (7,4) moins de 7% du GSH est

ionisé contre environ 90 % pour la CysGly, le pK_a du groupe $-SH$ étant de 6,4 pour la CysGly et de 8,5 pour le GSH (Drozd *et al*, 1998).

L'anion thiolate se transforme en présence de métaux de transition en un radical thiyl (RS^\bullet). En présence d'oxygène, les métaux de transition sont recyclés et conduisent à la formation de l'anion superoxyde, pouvant sous l'action de la superoxyde dismutase être transformé en peroxyde d'hydrogène. Les radicaux thiyls peuvent aussi propager une réaction en chaîne en réagissant directement sur les lipides ou capter un hydrogène des composés possédant un groupe alcool et entraîner ainsi la formation de radicaux carbonés (Figure 9).

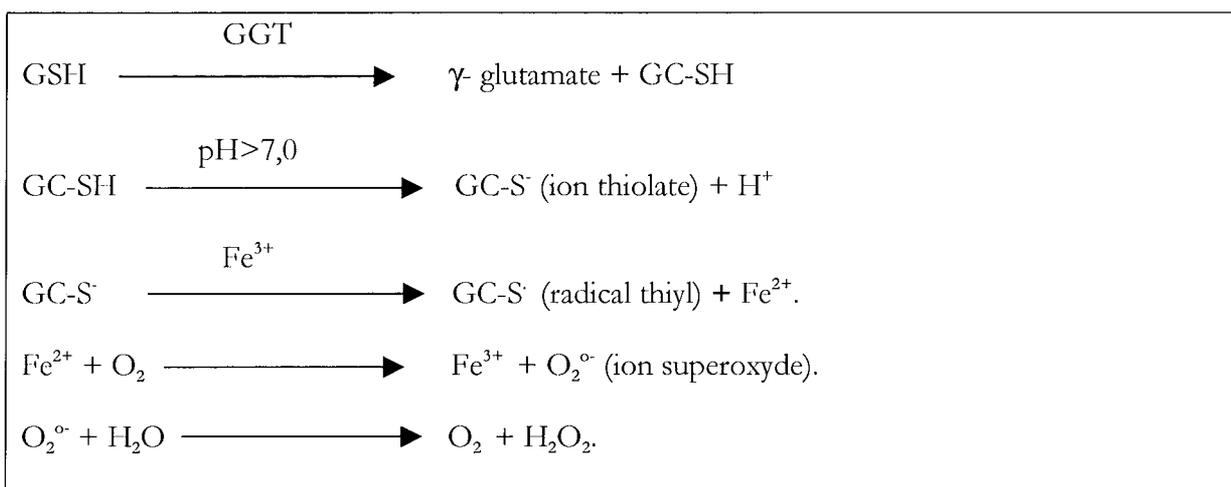


Figure 9: Origine du stress oxydant dépendant de la GGT.

2.2.1.3. Implications physiologiques du stress oxydant GGT dépendant

Bien que récemment mis en évidence, le stress oxydant GGT-dépendant a des conséquences physiologiques d'ores et déjà caractérisées dans des domaines variés :

L'implication de la GGT dans la peroxydation lipidique a été mise en évidence sur, des microsomes hépatiques de rat (Zalit *et al*, 1996 ; Paolicchi *et al*, 1997), des cellules d'hépatome humain en culture (Paolicchi *et al*, 1997), et plus récemment sur les LDL (Paolicchi *et al*, 1999).

De plus par des méthodes histochimiques, il a été montré une colocalisation de la GGT et de LDL oxydées au niveau des plaques d'athérome, suggérant le rôle de la GGT dans l'oxydation des LDL *in vivo* et donc dans le processus d'athérosclérose. Ces résultats pourraient expliquer la corrélation retrouvée entre les taux plasmatiques élevés en GGT et la mortalité par rechute

d'infarctus du myocarde rapportée lors d'études épidémiologiques (Wannamethee *et al.*, 1995, Emdin *et al.*, 2001).

Des modifications oxydatives des protéines au cours du métabolisme du GSH par la GGT ont été également signalées. Il s'agit de réactions d'oxydation et de S-thiolation des groupes -SH des protéines membranaires dans les cellules U937 (Dominici *et al.*, 1999). Par ailleurs, Del Bello *et al.* (1999) considèrent que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ produit par la GGT *via* le catabolisme du GSH, constitue un signal de survie et de prolifération cellulaire. En effet, sur la lignée monoblastique U937, la faible production de H₂O₂ (de l'ordre de 5 nmoles/10⁶ de cellules/H) obtenue au cours du métabolisme du GSH (100 µM) par la GGT était nécessaire au maintien de la croissance cellulaire. L'inhibition de cette production de peroxyde d'hydrogène par un inhibiteur spécifique de la GGT, l'acivicine, bloque la prolifération cellulaire et fait entrer les cellules en apoptose. Selon ces auteurs, le rôle pro-oxydant de la GGT procure des propriétés "anti-apoptotiques".

Des études plus récentes s'intéressent à l'effet du rôle pro-oxydant de la GGT sur la modulation des facteurs de transcription. Les travaux de Accaoui *et al.* (2000), ont montré en utilisant le couple cellulaire V79GGT/V79cl, exprimant ou non la GGT humaine, que le système GGT/GSH/Fe³⁺ active le facteur de transcription NFκB. Cette activation est fonction de la concentration en GSH (de 0,5 à 2,5 mM) et elle est inhibée par la catalase et passe donc probablement par une voie de transduction sensible à H₂O₂ produit lors du catabolisme du GSH par la GGT.

L'induction du facteur de transcription NFκB par le système GGT/GSH/Fe³⁺ a été rapportée par d'autres auteurs sur une lignée de mélanome Me665/2/60 exprimant des taux élevés de GGT en comparaison avec la lignée Me665/2/21 n'ayant qu'une faible activité GGT (Maellaro *et al.*, 2000). De même, Djavaheri-Mergny *et al.*, (2002) ont démontré que le catabolisme du GSH par la GGT est responsable d'une peroxydation lipidique au niveau de la membrane cellulaire qui entraînerait l'activation de NFκB.

La GGT est donc impliquée dans les phénomènes liés au stress oxydant par ses rôles anti- et pro-oxydants L'équilibre de ces fonctions serait influencé par différents facteurs, dont, en particulier la concentration des sources physiologiques de fer, celle du GSH, et le niveau d'expression de la GGT.

2.3. Rôles physiologiques de la GGT

La GGT constitue une enzyme clé du cycle du glutathion (GSH) car c'est la seule qui est capable de cliver la liaison γ -glutamyle du tripeptide et de ses dérivés (Figure 3). Elle est également impliquée dans la voie de biosynthèse des leucotriènes. Cependant le(s) rôle(s) précis de la GGT ne sont toujours pas totalement élucidés et de nouvelles fonctions ont été récemment attribuées à cette enzyme. Il existe très peu de patients ayant une déficience en GGT. Ces personnes présentent une glutathionurie élevée (concentration de GSH dans les urines), une glutathionémie (concentration de GSH élevée dans le sang), ainsi que des retards mentaux (Lieberman *et al*, 1996). Le GSH qui est le substrat majoritaire de la GGT est continuellement dégradé dans le plasma et les autres fluides (urine, bile) au niveau des organes riches en GGT (comme le rein ou le canal biliaire). Les cellules exprimant la GGT à la surface externe de leur membrane peuvent utiliser le GSH circulant comme source de cystéine pour maintenir leur statut redox et leur potentiel de détoxification lié au GSH. D'ailleurs, des fibroblastes transfectés par la GGT peuvent croître dans un milieu sans cystéine si celui-ci est complété en GSH (Hanigan *et al*, 1993). En 1996, l'équipe de Lieberman développe un modèle de souris transgéniques déficientes en GGT (souris "knock out"). Ces souris mutantes présentent un retard de croissance, elles sont immatures sexuellement, développent la cataracte et ont une mort prématurée. Le taux de GSH dans leurs urines et leur plasma est respectivement 2500 et 6 fois plus élevé que pour les souris sauvages. Au contraire, le taux de GSH est considérablement réduit dans des tissus comme les yeux, le foie, et le pancréas. Chez les souris mutantes, le taux plasmatique de cystéine est réduit de 80 %. L'administration orale de N-acétylcystéine à ces souris permet de restaurer un taux de croissance normal et d'inverser le développement précoce de la cataracte. En conclusion, l'examen de ce souris montre que la GGT a une activité clé dans la régulation du taux de GSH et dans l'approvisionnement des organes et des cellules en cystéine.

La GGT intervient également dans la voie des acides mercapturiques : de nombreuses substances, incluant des xénobiotiques comme certains médicaments deviennent des substrats de la GGT après leur conjugaison au GSH. Cette conjugaison a principalement lieu dans le foie et les composés conjugués sont alors excrétés des hépatocytes dans la bile ou le plasma via la pompe GS-X (Ishikawa *et al*, 1996) et sont ensuite métabolisés dans le rein après la filtration glomérulaire. Leur dégradation est initiée par la GGT qui clive la liaison γ -glutamyle pour donner des conjugués à la cystéine. Ceux-ci sont pris en charge par le rein qui les transforme en acides mercapturiques. En général, les conjugués à la cystéine sont facilement absorbés par le rein au niveau du tubule proximal et sont donc éliminés moins rapidement que les conjugués au GSH.

En plus d'intervenir dans le métabolisme du GSH et dans la détoxification des conjugués au GSH, la GGT est également impliquée dans une autre voie métabolique importante, celle des leucotriènes. Les leucotriènes sont des dérivés de l'acide arachidonique jouant un rôle de médiateurs dans la réaction inflammatoire, et probablement dans de nombreux autres phénomènes cellulaires. La GGT est impliquée dans la conversion réversible du leucotriène C₄ (LTC₄) en leucotriène D₄ (LTD₄), responsable de la prolifération et différenciation myéloïde normale. Cependant, dans différents tissus de souris déficientes en GGT, la conversion du LTC₄ en LTD₄ a été mise en évidence malgré l'absence de GGT (Carter *et al*, 1997). Il a été prouvé que cette réaction peut être catalysée par une autre enzyme : la γ -glutamyl leucotriénase.

La GGT, de par son rôle dans le métabolisme du glutathion, des leucotriènes et dans le transport transmembranaire des acides aminés, intervient dans de nombreux processus physiologiques de la cellule, dans les réactions inflammatoires et dans la protection et/ou la genèse de dommages cellulaires.

Depuis quelques années, de nouveaux horizons se dessinent pour la GGT, et de nouvelles implications pouvant avoir des conséquences physiologiques importantes lui sont attribuées.

2.4. Historique des travaux sur les gènes de la GGT humaine

Auteur	Résultat
Bulle F <i>et al</i> , 1987	Localisation de 2 gènes de la GGT humaine sur le chromosome 22.
Pawlak A <i>et al</i> , 1988	Les auteurs démontrent que chez l'homme, la GGT est codée par au moins 4 gènes ou pseudogènes.
Heisterkamp et Groffen 1988	Identification du gène de la GGT comme un gène dupliqué dans les loci du bcr (breakpoint cluster region).
Rajpert-De Meyts <i>et al</i> , 1988	Séquence de l'ADNc de la GGT issu du placenta.
Sakamuro <i>et al</i> , 1988	Séquence de l'ADNc de la GGT issu du foie fœtal
Goodspeed, 1989	Séquence de l'ADNc de la GGT issu de l'hépatome HepG2 et comparaison avec les 2 premières séquences publiées : les données suggèrent que les 3 ADNc soient issus du même gène (ARNm de type I), ils possèdent le même cadre de lecture ouvert mais différent par leur extrémité 5' non traduite.
Pawlak <i>et al</i> , 1989	A partir d'une banque d'ADNc de rein, clonage d'une séquence de la GGT présentant une mutation et une délétion de 30 pb (ARNm de type II).
Pawlak <i>et al</i> , 1990	Mise en évidence d'un ADNc contenant une insertion de 22 pb (générée par un épissage alternatif) introduisant un codon stop prématuré. Cet ARNm pourrait coder pour une protéine tronquée.
Visvikis <i>et al</i> , 1991	Les ARN de type I codent pour une enzyme qui possède les mêmes propriétés catalytiques que la GGT purifiée à partir de tissus humains.
Courtay <i>et al</i> , 1992	Séquence de l'ADNc de la GGT issu du pancréas (ARN de type I). Il code pour la même protéine que ceux issus du placenta et HepG2. Cet ARN est exprimé dans tous les tissus humains étudiés.
Figlewicz <i>et al</i> , 1993	Etablissement de la carte des gènes et pseudogènes de la GGT sur le chromosome 22 et 18, 19 et 20. Identification de 3 loci sur le chromosome 22 dont 2 à proximité de la région BCR (breakpoint cluster région).
Wetmore <i>et al</i> , 1993	Mise en évidence d'un ARN tronqué spécifique du poumon codant pour la sous unité légère de la GGT.
Courtay <i>et al</i> , 1994	Etude de l'expression de 7 gènes potentiels de la GGT dans différents tissus humains. Un gène est exprimé de façon ubiquitaire : le gène I qui est transcrit en ARN de type I. 4 autres gènes sont exprimés de façon tissu spécifique.
Leh <i>et al</i> , 1996	Caractérisation d'un nouveau type d'ARNm codant pour la GGT humaine (type III). Cet ARNm présente plusieurs points de mutations et un intron non épissé de 81 pb dans le cadre ouvert de lecture. Cet ARN est tronqué et il est exprimé dans le placenta, le poumon et la sigmoïde. D'autre part, il est exprimé dans 50 % des leucémies lymphoblastiques aiguës, mais pas dans les lymphocytes sains.
Tsutsumi <i>et al</i> , 1996	Etude de l'expression des 3 ARNm de type 1 de la GGT dans différents tissus humains. Mise en évidence de la spécificité tissulaire de l'expression de la GGT. L'expression du sous type issu de la lignée HepG2 est liée au développement des carcinomes hépatique.
Collins <i>et al</i> , 1997	Organisation des gènes et pseudogènes de la GGT humaine répétés sur le chromosome 22q11.
Leh <i>et al</i> , 1998	Clonage et caractérisation du gène I de la GGT. Identification d'un promoteur intronique qui contrôle la transcription des ARNm tronqués.
Visvikis <i>et al</i> , 2001	Publication de la structure des régions 5' non traduites du gène I de la GGT. Caractérisation du promoteur codant pour l'ARNm de type I clonés à partir de la lignée d'hépatome HepG2.

Tableau I : Historique des travaux sur les gènes de la GGT humaine.

Aucune nomenclature officielle ou généralement acceptée n'existe ou n'a été proposée pour les différents gènes de la GGT. Dans un souci de simplification et de clarté, nous avons attribué à chaque gène et à son (ses) ARNm correspondant un numéro latin. Le gène principal, celui qui code pour la protéine active et dont l'expression est ubiquitaire est nommé gène I, les ARNm transcrits à partir de ce gène sont appelés ARNm de type I, et en particulier, ARNm I_A, ARNm I_B et ARNm I_C.

➤ Travaux sur l'organisation chromosomiques de la GGT

- En 1987, Bulle *et al* ont localisé par hybridation *in situ* des séquences de la GGT sur le chromosome 22 au niveau de deux *loci*, q111-112 et q131, ils suspectent alors l'existence d'une famille multigénique. Un an plus tard, Pawlak *et al* ont démontré que la GGT humaine est codée par au moins 4 gènes ou pseudogènes différents. En 1988, Heisterkamp *et al* identifient le gène de la GGT dans les loci bcr (breakpoint cluster region) sur le chromosome 22, comme un gène dupliqué lors de la translocation Philadelphie. Il s'agit d'une translocation réciproque entre les bras long des chromosomes 9 et 22 : t(9;22)(q34;q11) retrouvée dans 96 % des leucémies myéloïdes chroniques).

- En 1992, Figlewicz *et al* publient la cartographie des gènes et pseudogènes de la GGT humaine. Trois loci sont localisés sur le chromosome 22 mais l'un d'eux ne contient pas la séquence complète. En utilisant des cellules somatiques hybrides, les auteurs ont pu mettre en évidence des séquences relatives à la GGT sur les chromosomes 18, 19 et 20. Cependant, la plupart des loci identifiés correspondent à des pseudogènes.

➤ Travaux sur les banques d'ADNc

- L'étude des banques d'ADNc issues de différents tissus humains a permis d'isoler 3 ARNm correspondant à la GGT humaine (Rajpert-De Meyts *et al*, 1988; Sakamur *et al*, 1988; Goodspeed *et al*, 1989). Ils possèdent tous les trois le même cadre ouvert de lecture de 1707 pb, mais différent par leur extrémité 5' non traduite (5' NT). Ces ARNm sont supposés être transcrits du même gène (gène I) et sont nommés ARNm de type I (ARNm I).

- En 1991, Visvikis *et al* établissent à partir de la lignée V79 de fibroblaste de hamster chinois une lignée transgénique exprimant l'ADNc de la GGT issu des cellules d'hépatome HepG2 (Goodspeed *et al*, 1989). L'enzyme recombinante a été caractérisée : elle possède les mêmes propriétés catalytiques que celle purifiée à partir de tissus humains. Ces résultats montrent que les ARNm I codent pour une enzyme fonctionnelle.

- Un ARNm, différent des 3 précédents par une mutation ponctuelle et une délétion de 30 pb a été isolé à partir d'une banque d'ADNc de rein humain par Pawlak *et al* (1989). Ceci souligne la complexité de l'expression génomique de la GGT humaine. Cet ARNm est appelé ARNm de type II.

- Le criblage d'une banque d'ADNc de foie par Pawlak *et al*, (1990) a mis en évidence un ADNc contenant une insertion de 22 pb due à un épissage alternatif. Cette insertion génère l'introduction d'un codon stop prématuré. La traduction de cet ARNm (ARNm de type I tronqué) pourrait aboutir à une protéine tronquée correspondant à la sous unité lourde de la GGT. D'autre part, les auteurs démontrent que cet ARNm est exprimé dans d'autres tissus humains (rein, cerveau, intestin, estomac, placenta et glande mammaire). Ils suggèrent que cet épissage alternatif puisse participer à la régulation de l'activité GGT, et expliquer la détection de formes non actives dans certains tissus.

- Courtay *et al* (1992) ont isolé un nouvel ADNc de type I à partir d'une banque d'ADNc de pancréas. Cet ARNm possède de fortes similitudes avec celui isolé par Goodspeed *et al* (1989) : le cadre de lecture ouvert est identique, l'extrémité 5' NT montre la même organisation, bien que plus courte. Par contre, ces ARNm diffèrent par leur extrémité 3' non traduite (3' NT).

- En 1993, l'étude d'une banque d'ADNc de poumon a permis de mettre en évidence une population de messagers de la GGT spécifique de ce tissu. En effet, en plus de l'ARNm de type I, Wetmore *et al* ont caractérisé une population de messagers plus courts (1,2 contre 2,4 kb) qui est présente en quantité abondante dans le poumon et qui hybride avec la moitié 3' de l'ADNc issus de la lignée HepG2 complet (Goodspeed, *et al* 1989). Cet ARNm pourrait en fait coder pour la sous unité légère de la GGT (ARNm de type I tronqué).

➤ Travaux sur l'expression et la régulation des gènes de la GGT

- Afin de mieux comprendre l'expression et la régulation de la GGT humaine, Courtay *et al* (1994) ont étudié par PCR l'expression des 7 gènes potentiels de la GGT en utilisant des hybridations

spécifiques pour chacun d'entre eux. Deux des gènes étudiés ne sont pas exprimés, les autres montrent une expression restreinte à certains tissus. Un seul gène (le gène I) est exprimé de manière ubiquitaire tous les tissus testés. C'est d'ailleurs celui qui code pour les ARNm I.

- En 1994, Tsutsumi *et al* s'intéressent à la régulation de l'expression de la GGT durant le développement des carcinomes hépatiques car cette maladie est souvent accompagnée d'une augmentation de l'activité GGT. Ils sont les premiers à utiliser les amorces correspondant aux régions 5' NT spécifiques des 3 ARNm de type I et à étudier la régulation de leur expression par transcription inverse suivie de PCR spécifiques. Les auteurs décident de nommer les ARNm sous type A (ARNm I_A), B (ARNm I_B) et C (ARNm I_C) pour respectivement les sous type issus de la banque d'ADNc de foie fœtal (Sakamur *et al*, 1985), hepatome HepG2 (Goodspeed *et al*, 1989) et placenta (Rajpert-De Meyts *et al*, 1988). L'étude de l'expression des 3 sous types a montré que l'expression du sous type B était étroitement liée au développement de carcinomes hépatiques.

➤ Clonage et caractérisation des gènes de la GGT

- En 1996, Leh *et al* décident de cloner et de caractériser le produit de l'expression du gène III de la GGT humaine. Ils mettent alors en évidence un nouveau type d'ARNm (ARNm de type III), différant des types I et II déjà décrits par plusieurs mutations ponctuelles et la présence d'un intron non épissé de 81 pb dans le cadre ouvert de lecture. La taille des ARNm de type III clonés n'excède jamais 1,2 kb, ce sont des ARNm tronqués. D'autre part, ces ARNm tronqués de type III sont exprimés dans 50 % des cas de leucémies lymphoblastiques aiguës et pourraient constituer un marqueur spécifique de la maladie. Il est fort probable que de ce type d'ARNm proviennent d'une duplication de la partie 3' du gène I (codant pour la petite sous unité de la GGT).

- En 1998, Leh *et al* parviennent à cloner et à caractériser un fragment génomique contenant les séquences codantes pour les ARNm de type I. Les auteurs ont utilisé une banque d'ADN génomique humain et ont isolé des cosmides contenant des séquences relatives à la GGT. L'un d'eux contient tous les exons codants, et sa carte de restriction correspond à celle du gène I. Il a donc été utilisé pour l'étude de la structure du gène. La structure des jonctions introns/exons a été déterminée en comparant la séquence du gène et celle des ARNm. La partie codante du gène est constituée de 12 exons et de 11 introns étendus sur une zone de 16 kb. L'organisation est comparable à celle du gène de la GGT de rat. Les exons 1 à 7 codent pour la sous unité lourde,

les exons 7 et 8 sont séparés par un intron de 3,9 kb. Cet intron possède à son extrémité 3' les séquences correspondant à l'extrémité 5' non traduite des ARNm tronqués de type I. En fait, cet intron contient un promoteur qui régule de façon tissu-spécifique l'expression des ARNm tronqués. Les exons 8 à 12 codent pour la sous unité légère de l'enzyme. (Figure 10). Ces données renforcent l'idée que les ARNm de type III retrouvés dans les leucémies lymphoblastiques aiguës proviendraient d'une duplication de la partie 3' du gène I.

- En 2001, Visvikis *et al* publient les structures des régions 5' non traduites des 3 ARNm de type I (A, B et C). En utilisant la même banque que précédemment (Leh *et al*, 1998), les auteurs ont isolé un cosmide dont la séquence relative à la GGT s'hybride avec chacune des 3 sondes spécifiques des ARNm I_A, I_B et I_C. Après analyse de la carte de restriction du cosmide, 3 fragments différents ont été sous clonés, chacun contenant une séquence spécifique de l'un des 3 ARNm. La comparaison avec les séquences sur le chromosome 22 a permis de déterminer l'organisation de la région 5' NT du gène I de la GGT humaine (cf Figure 11). D'autre part, les auteurs ont localisé et caractérisé le promoteur qui régule la transcription de l'ARNm I_B.

2.5. Connaissances actuelles sur l'organisation génomique de la GGT

La Figure 10 résume l'organisation génomique de la GGT telle qu'on la connaît aujourd'hui.

Organisation génomique de la GGT humaine:

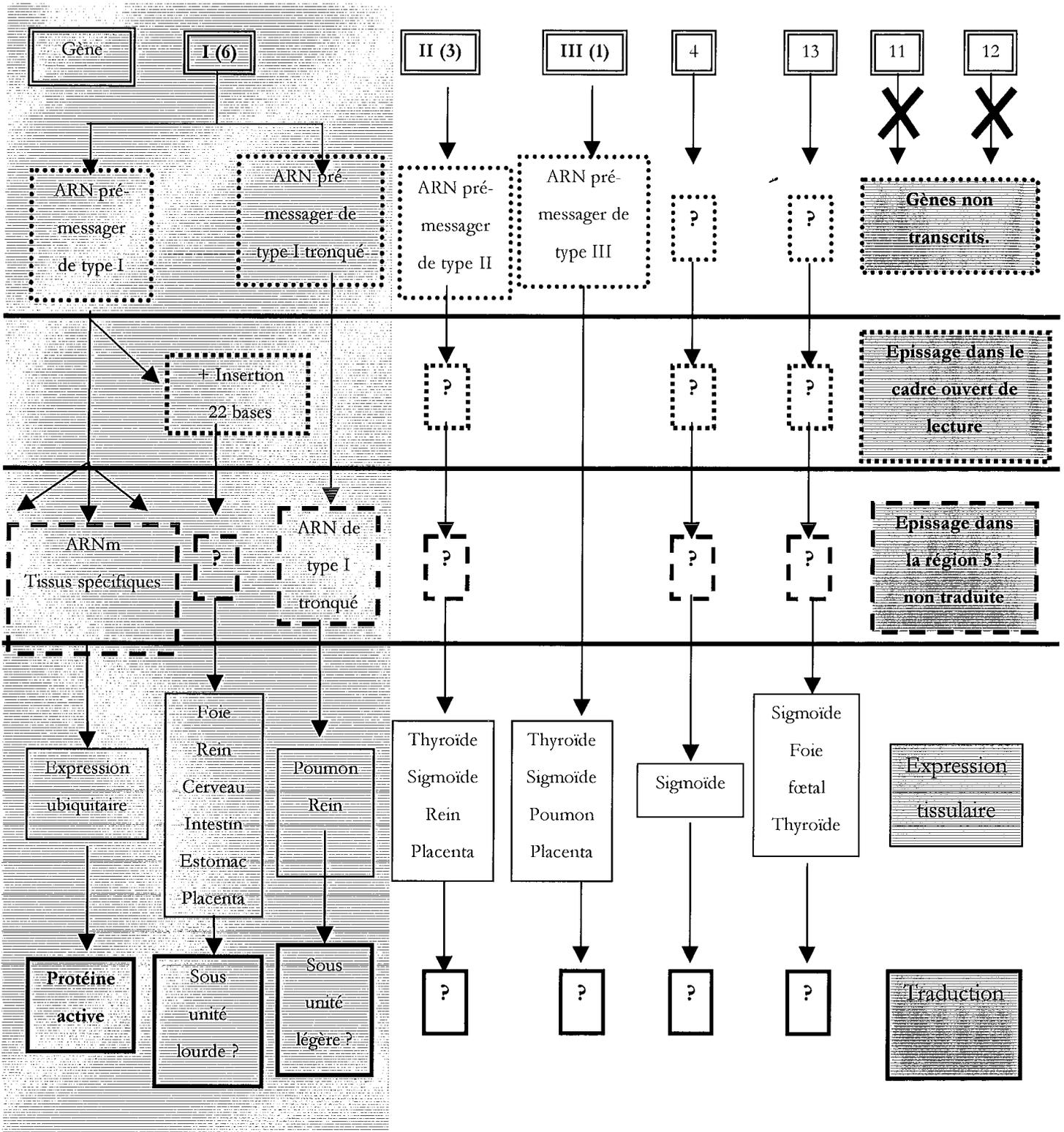


Figure 10 : Organisation génomique de la GGT humaine. Les numéros de gènes entre parenthèses correspondent à la nomenclature de Courta y *et al* (1994).

Récapitulons les connaissances actuelles sur l'organisation et l'expression des gènes de la

GGT humaine :

- Sur les 7 gènes décrits, 2 ne sont pas transcrits et un seul aboutit à l'expression de l'enzyme fonctionnelle (le gène I). Les autres gènes pourraient coder pour des protéines modifiées (tronquées ou mutées) dont le rôle physiologique n'est pas encore élucidé. Ces protéines modifiées n'ont d'ailleurs jamais pu être mises dans les tissus humains.
- Les différents ARNm issus de ces gènes montrent une spécificité tissulaire pour leur expression. Seuls les ARNm de type I (ceux qui codent pour la protéine active) sont retrouvés dans tous les tissus.
- L'ARNm de type I contenant une insertion de 22 pb est retrouvé dans plusieurs tissus. La traduction de ce message aboutirait à une protéine inactive correspondant à la sous unité lourde de la GGT. Cette insertion est liée à un mécanisme d'épissage qui pourrait servir pour la régulation de l'expression de la GGT.
- L'existence d'ARNm de type I tronqués retrouvés dans les poumons et le rein provient de l'utilisation d'un promoteur particulier sur le gène I. Ce promoteur intronique se trouve entre l'exon VII et l'exon VIII et il dirige la transcription d'un ARNm codant potentiellement pour la sous unité légère de la GGT.

Comme nous l'avons vu, la GGT humaine possède une organisation génomique particulièrement complexe. Le profil d'expression des différents ARNm est également loin d'être simple. Cependant, l'origine et l'utilité d'une telle diversité ne peut pas être expliquée tant que la structure de tous les gènes et les propriétés de toutes les protéines potentiellement codées par ces gènes ne sont pas élucidés.

2.6. Structure du gène I de la GGT humaine

Le gène I de la GGT humaine est celui dont la structure et la régulation sont les mieux connues car c'est le gène qui code pour la protéine active. Dans la suite de cette étude, nous nous intéresserons donc uniquement à ce gène.

2.6.1. Structure de la région codante du gène I de la GGT humaine

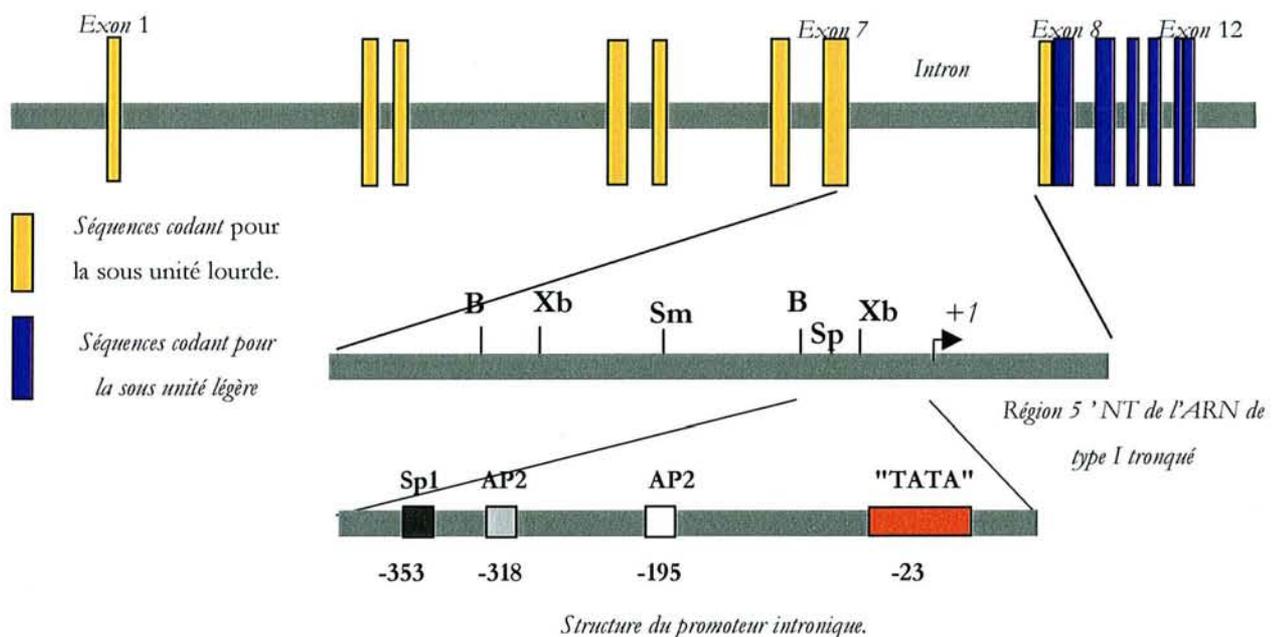


Figure 11 : Structure de la région codante du gène de type I de la GGT humaine. D'après Leh *et al*, (1998).

La Figure 11 représente la structure de la région codante du gène I

Les régions codantes du gène I de la GGT humaine s'étendent sur une vaste région de 16 kb. Elle est codée par 12 exons, les exons 1 à 7 codent pour la sous unité lourde, et les exons 8 à 12 pour la sous unité légère.

Le premier exon codant contient le codon initiateur, les 54 premiers codons, ainsi que les 7 premières bases des régions 5' NT. Le second exon est éloigné du 1^{er} d'au moins 3 kb alors que l'intron séparant les exons 2 et 3 ne contient que 135 pb. Les exons 4 et 5 sont portés par un unique fragment de restriction *Sma*I de 2 Kb, et sont éloignés des exons 3 et 4 d'au moins 3 kb.

Les exons 7 et 8 sont séparés par un intron de 3,8 kb particulier : il contient le promoteur qui contrôle l'expression des ARNm tronqués de type I décrit par Wetmore *et al* (1993) (dont la traduction peut potentiellement aboutir à la petite sous unité de la GGT). Cette séquence intronique montre une activité promotrice dans toutes les lignées cellulaires testées. Elle présente une région riche en A et en T qui pourrait être reconnue par le facteur TFII-D spécifique de la séquence TATA. L'analyse de cette séquence a montré la présence de sites potentiels pour la fixation des facteurs de Sp1 et AP2 qui pourraient participer à la régulation de l'activité promotrice (Leh *et al*, 1998).

2.6.2. Structure de la région 5' non traduite du gène I de la GGT humaine

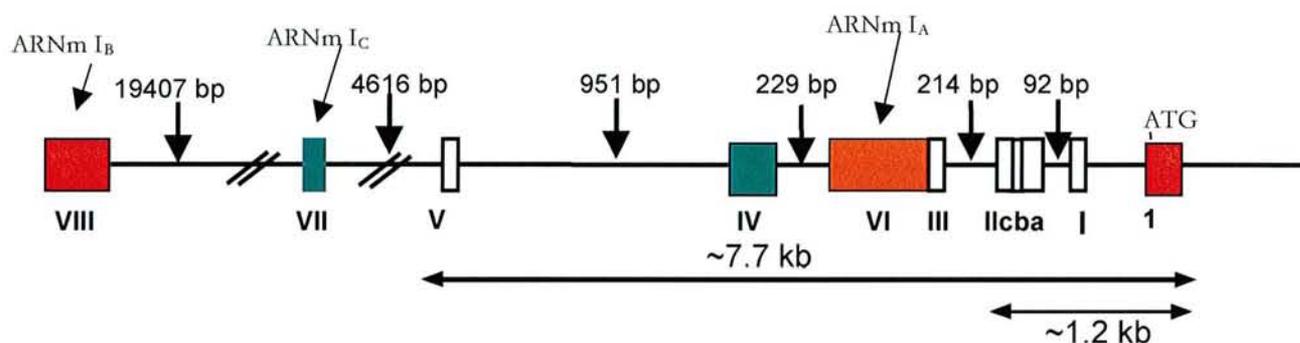


Figure 12 : structure de la région 5' du gène de la GGT humaine.

Après avoir caractérisé la région codante du gène I, Visvikis *et al* (2001) se sont penchés sur la structure de la région 5'NT du gène I. Les structures exons/introns ont été déterminées en comparant les séquences du cosmide c507 (contenant les séquences correspondant aux régions 5'NT des 3 ARNm de sous type I) à celles des séquences de la GGT sur le chromosome 22.

Les exons sont présentés par les rectangles et sont numérotés d'après Chikhi *et al* (1999). L'exon 1 contenant le codon d'initiation de la traduction est représenté en rouge, et les exons communs à plusieurs ARNm sont représentés en blanc. L'exon VI est spécifique du sous type A, l'exon VIII est spécifique de l'ARNm I_B et les exons IV et VII sont spécifiques de l'ARNm I_C.

Les analyses ont montré que les exons désignés IIa, IIb, et IIc, ne sont pas séparés par des introns. Ces exons ont respectivement des tailles de 95, 21 et 87 pb. En fait, l'exon IIc se termine

par un AG, l'exon IIb commence par un GT et se termine par un AG. De même, les exons III et VI ne sont pas séparés par un intron et l'exon VI se termine par un AG. Ces dinucléotides constituent des sites potentiels d'épissage et expliquent les événements d'épissage qui conduisent à la structure des régions 5'NT particulière à chaque sous type de messagers de type I (Figure 13).

2.6.3. Structure des régions 5' non traduite des 3 ARNm de type I

D'après la Figure 12, et l'analyse de la séquence de la région 5' du gène I, il est possible de déterminer les événements d'épissage dans la région 5' non traduite aboutissant à la formation des ARNm I_A, I_B, et I_C (Figure 13).

La Figure 13 décrit l'organisation des régions 5' non traduites des 3 sous types A, B et C de messagers de groupe I.

Les sites internes d'épissage ne sont pas utilisés pour la région 5'NT de l'ARNm de sous type B, et par conséquent, cet ARNm contient les 3 exons IIa, IIb, et IIc. Pour l'ARNm de sous type C, le dinucléotide AG à la fin de l'exon IIb agit comme site accepteur d'épissage, et le site donneur correspondant est le dinucléotide GT au début de l'intron séparant les exons IV et VI. Dans cette région 5' NT, on retrouve l'exon VI adjacent à l'exon IIa. Dans le cas de l'ARNm de sous type A, le dinucléotide GT au début de l'exon IIb est le site donneur, le site accepteur correspondant étant le dinucléotide AG à la fin de l'intron séparant les exons IIa et I. Ainsi, dans cet ARNm, l'exon IIc est adjacent à l'exon I.

moins 145 pb de plus que les séquences connues alors que le clonage par 5' RACE a révélé l'existence des séquences supplémentaires qui étendent cette région 5'NT à 741 pb. En fait, la transcription de cet ARNm peut être initiée à plusieurs endroits. Les résultats des expériences de transfection transitoire ont confirmé le fait que la région en amont de cet exon est une séquence promotrice. Plusieurs sites potentiels de fixation des divers facteurs de transcription sont présents dans cette région. Un élément " initiateur " est situé à de- 125 - 114. L'existence d'autres promoteurs sur le gène I pour le contrôle de la transcription des 2 autres sous types de messagers reste à démontrer.

**L'ensemble de ces résultats suggère que chez l'homme l'expression de la GGT
peut être contrôlée à plusieurs niveaux :**

- **au niveau transcriptionnel par l'utilisation de multiples promoteurs et au sein de chaque promoteur par les séquences régulatrices présentes ;**
- **au niveau post-transcriptionnel par des événements d'épissage alternatif et/ou spécifique du type cellulaire; ces épissages ont lieu soit dans la région 5' NT soit dans la région codante.**
- **La taille importante des région 5' NT suggère la présence d'éléments régulateurs de la traduction.**

2.7. Comparaison de l'organisation du gène I de la GGT humaine avec celui du rat et de la souris

D'après la revue de Chikki *et al.*, (1999).

2.7.1. Structure du gène de la GGT de rat

Chez le rat, il existe 7 transcrits de 2,2 à 2,6 kb issus du même gène. Leurs séquences sont identiques à partir de la position - 144, jusqu'à leur extrémité 3'. Ils diffèrent, comme les ARNm de la GGT humaine par leur extrémité 5' non traduite, ces ARN codent pour la même protéine. La seule copie du gène de la GGT de rat couvre une séquence de 34 kb. Comme chez l'homme, la séquence codante est constituée de 12 exons qui couvrent une séquence d'environ 12 kb : 7 exons codent pour la chaîne lourde et 5 pour la chaîne légère. La région 5' non traduite s'étend sur 22 kb et est constituée de 6 exons. Les sites d'initiation de la transcription ont été situés sur le gène immédiatement en amont des séquences "leader" pour les ARNm I à IV. Les séquences en amont de ces sites de transcription présentent une activité promotrice lorsqu'elles sont clonées devant un gène reporter et transfectées dans différentes lignées cellulaires. Ainsi, les ARNm de la GGT de rat sont transcrits à partir de 5 promoteurs PI à PV. Les promoteurs 4 et 5 donnent deux transcrits primaires ou l'exon IV-2 est épissé ou non. Tous les promoteurs (sauf le 3) montrent une très forte spécificité tissulaire. Les ARNm transcrits à partir du promoteur 3, au contraire sont retrouvés dans tous les tissus de rat.

2.7.2. Structure du gène de la GGT de souris

La seule copie du gène est transcrite à partir de 7 promoteurs en 7 ARNm différents par leur extrémité 5' non traduite mais possédant le même cadre de lecture ouvert. L'organisation introns/exons est similaire à celle décrite pour le rat. Les 12 exons de la partie codante couvrent une région de 12 kb sur le gène. Toutes les régions 5' NT des différents ARNm s'étendent sur un fragment de 10 Kb. Les promoteurs montrent une expression spécifique des tissus: les promoteurs II, III et IV sont plus actifs dans le rein, le foie fœtal, et le petit intestin

respectivement (Lieberman *et al*, 1995). Par contre, le promoteur I est moins actif dans le rein que chez le rat, de même, l'expression du P III est moins ubiquitaire que chez le rat.

Il est intéressant de comparer l'organisation des régions 5' NT des gènes des différentes espèces afin de situer les différents promoteurs. La Figure 14 montre l'alignement des séquences des régions 5' non traduites de la GGT de l'homme, du rat et de la souris :

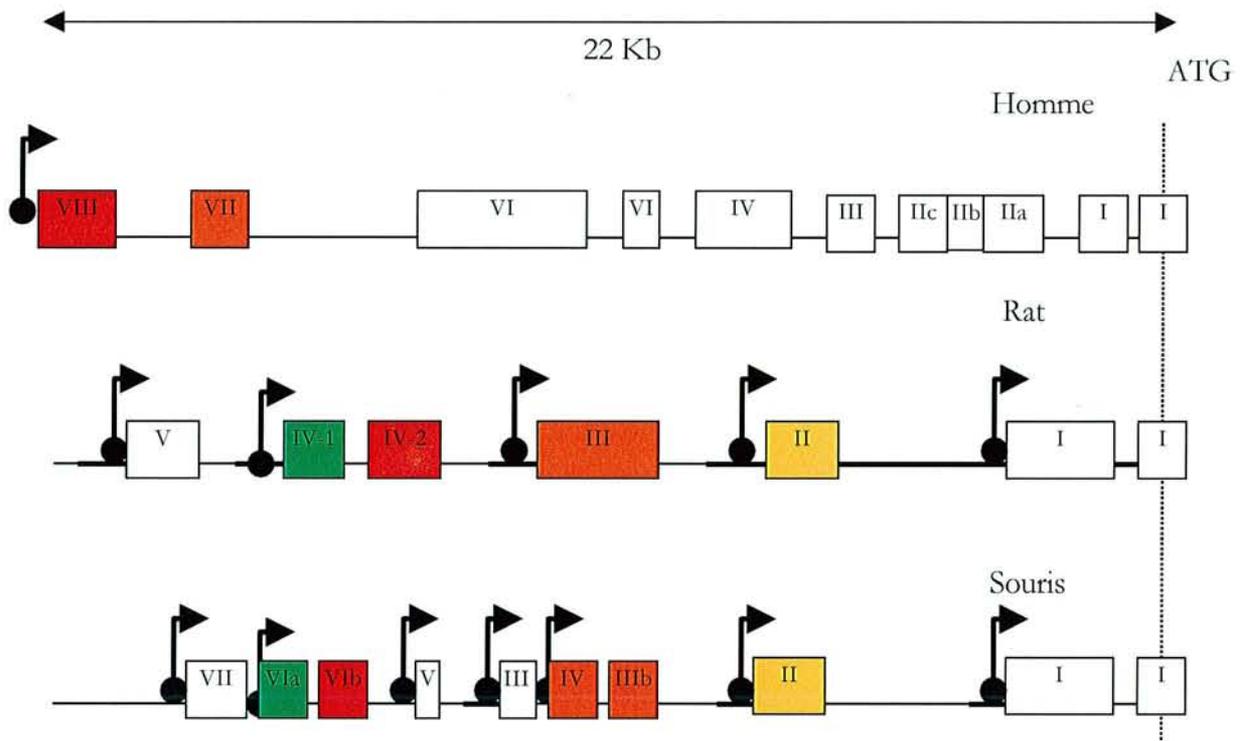


Figure 14 : Comparaison de l'organisation des régions 5' non traduites du gène de la GGT de différentes espèces. Les promoteurs identifiés dans des études fonctionnelles sont représentés par des cercles colorés et des flèches qui montrent le site d'initiation de la transcription. Les exons présentant de forts degré d'homologie sont représentés de la même couleur. Les exons représentés en blanc sont spécifiques de leur espèce. D'après Chikki *et al*, (1999).

L'alignement des régions 5' non traduites révèle des aires d'homologie importantes : les exons I, II, III, IV-2 et IV-1 de rat peuvent s'aligner avec les exons I, II, IIIb et IV, VIb et VIa de la souris avec des identités de 74 à 90 %.

L'exon 1 du gène humain montre 71 % d'homologie avec ceux du rat et de la souris. Les exons IIb et IIc s'alignent avec l'extrémité 5' de l'exon I du rat et de la souris. L'exon VII est homologue à 76% et 81% à l'exon leader de souris IV et à l'exon leader de rat III respectivement.

Plusieurs promoteurs ont été caractérisés chez le rat (P1 à P5) et chez la souris (PI à PVI), ils présentent de fortes homologies entre eux : les séquences proximales des promoteurs P1, P2, P3 et P4 sont homologues aux promoteurs PI, PII, PIV et PVI respectivement (80 à 90 % d'homologies). Par analogie, le promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm I_b pourrait être comparé au promoteurs PVI de souris et P4 de rat puisqu'ils sont les plus proches de l'exon analogue à l'exon VIII humain. Chez le rat et la souris, ces régions promotrices ne montrent pas de région TATA ou de d'éléments initiateurs à proximité du +1. Seul un site AP1 à la position -18 à -25 est retrouvée chez les deux espèces. Sur le gène humain, l'analyse du promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm I_b a révélé que cette région ne possède pas non plus de séquence TATA, mais un site SP1 est présent à la position -145 à -167 et pourrait être responsable de l'initiation de la transcription.

Il faut également noter la taille exceptionnellement longue de ces régions 5' NT', par rapport à la majorité des autres messagers. L'analyse des structures dans les régions 5' NT' des gènes de rat et de souris ont montré des séquences inversées qui peuvent potentiellement former des structures secondaires sur les messagers et avoir une influence sur la régulation de la traduction. Cependant, le rôle de ces structures sur la stabilité des ARNm et sur la régulation de la traduction est encore inconnu.

Il n'est pas simple de décrire l'organisation du gène humain de la GGT qui s'avère particulièrement complexe par rapport à celle de la plupart des autres gènes ou même par rapport à l'organisation du même gène chez d'autres espèces. Cependant, cette complexité permet également l'utilisation de multiples mécanismes de régulation de l'expression de cette enzyme et suggère un rôle physiologique important. Il reste encore à ce jour de nombreux points à éclaircir, notamment l'identification des sites de transcription des ARNm de type I, ainsi que des séquences régulatrices.

2.8. Régulation de l'expression de la GGT

2.8.1. Régulation de l'homéostasie du GSH

Avant de décrire la régulation de la GGT, il est important de rappeler les principaux mécanismes de régulation des autres enzymes contrôlant l'homéostasie du GSH. En effet, ces régulations sont le plus souvent associées lors de la réponse cellulaire à un stress oxydant ou à un traitement par des xénobiotiques. Ainsi, la concentration intracellulaire en GSH va dépendre du taux d'expression des enzymes de synthèse (γ GCS, GS), des enzymes consommant le GSH (GST), ainsi que des enzymes du recyclage redox (GR, GPx). De plus, la connaissance de la régulation de ces enzymes peut apporter des indications sur les mécanismes régulant l'expression de la GGT.

2.8.1.1. Régulation de l'expression de la γ GCS

La γ GCS est constituée de deux sous unités qui sont codées par des gènes différents. La sous unité lourde porte le site catalytique, et la sous unité légère agit comme un régulateur. La γ GCS est l'enzyme limitante pour la synthèse du GSH, et son activité est régulée physiologiquement par la disponibilité en cys, et par la concentration en GSH intracellulaire (inhibition feed back). Les régions promotrices des sous unités contiennent des sites de fixation pour AP1 et NF κ B et des éléments de réponse aux antioxydant (ARE). Elles sont régulées par les facteurs de croissance, les cytokines inflammatoires et le TNF α dans les cellules pulmonaires (Rahman *et al*, 2000). Un stress oxydant généré par H₂O₂ induit l'activité γ GCS dans ces cellules *via* une induction de la transcription de la sous unité lourde. Cette induction est associée à l'activation et à la fixation du facteur AP1 sur son site (Rahman *et al*, 1996) et aboutit à une augmentation de la concentration intracellulaire en GSH. Le site ARE peut fixer les facteurs Nrf1 ou Nrf2 associés à une protéine de la famille Jun (cJun, JunB ou JunD). La fixation de ces facteurs au site ARE permet l'induction coordonnée de l'expression de la γ GCS et de la NAD(P)H quinone oxydoreductase (enzyme de détoxification de phase II) (Jeyapaul *et al*, 2000). La γ GCS est également induite de façon coordonnée avec la pompe GS-X par les métaux lourds (Ishikawa *et al*, 1996) probablement *via* la fixation de AP1 au niveau des régions promotrices de ces deux gènes.

2.8.1.2. Régulation de l'expression de la glutathion synthétase

Alors que la régulation et la structure des gènes de la γ GCS sont bien étudiées, la régulation de la GS est beaucoup moins bien connue. Huang *et al* (2000), étudient l'effet des agents inducteurs de la γ GCS sur l'expression de la GS de rat. Les auteurs ont montré que les agents qui induisent l'expression des deux sous unités de la γ GCS sont également responsables de l'induction de l'activité GS. Par contre, les agents n'induisant que la transcription de la sous unité lourde (comme l'insuline, l'hydrocortisone ou l'éthanol) n'ont aucun effet sur l'expression de la GS. Cependant, les mécanismes impliqués dans la régulation de cette enzyme ne sont pas élucidés.

2.8.1.3. Régulation de la glutathion S transférase

Les GST font partie d'une famille multigénique. Parmi ces gènes, intéressons nous à celui de la GSTP1-1 dont la surexpression est retrouvée dans des lignées résistantes à des anticancéreux comme la lignée VCREMS dérivée de la lignée MCF-7 (cellules de cancer du sein) ayant acquis une résistance à la vincristine d'un facteur 11 et à la doxorubicine et à l'étoposide d'un facteur 3 (Whelan *et al*, 1992). Le gène humain de cette enzyme a été étudié par Morrow *et al* (1989) qui ont décrit la présence d'une TATA box présente à la position - 29, de deux séquences Sp1, d'une séquence de fixation pour AP1 proche des séquences TRE et ARE (de consensus TGACNNNGC) et d'un site de fixation pour le facteur NFkB en position - 95 à - 105. Ainbinder *et al* (1997) ont montré que la facteur AP1 constitué des sous unités Jun et Fos joue un rôle central dans l'activation du gène en réponse à des agents chimiques comme le 3-methylcholanthren ou le beta-naphthoflavone. Une étude par Xia *et al* (1996) a montré que le gène de la GSTP1-1 est régulé par le statut redox de la cellule. Ainsi, un traitement par H₂O₂ induit l'activité promotrice du gène et cette induction nécessite la présence du site AP1 et du site NFkB.

2.8.1.4. Régulation de la glutathion peroxydase

Les GPx sont impliquées dans la résistance aux radicaux libres et aux peroxyde. L'analyse de la région 5' régulatrice de ce gène montre qu'elle contient deux éléments de réponse à l'oxygène ORE 1 et ORE 2 (Cowan *et al*, 1993), permettant aux cellules d'ajuster le niveau d'expression de la GPx pour lutter contre une situation d'hyperoxie, mais également quelques sites de fixation pour AP1 et des sites *AP1 like*. D'ailleurs, Jornot et Junot (1997) ont montré que ces sites sont

responsables de l'induction de l'expression de la GPx dans des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en réponse au traitement par le 12,13-dibutyrate de phorbol.

2.8.1.5. Régulation de la glutathion reductase

Très peu de données bibliographique existent sur les mécanismes de régulation du gène humain de la GR. Une étude portant sur la GR de levure a néanmoins montré que l'expression de cette enzyme est induite de 2 à 3 fois en présence d'agents oxydants et que cette régulation est dépendante de la protéine γ AP1 (AP1 de levure). En fait, la GR constitue l'un des nombreux gènes de levure qui sont induits en réponse à un stress oxydant et régulés par γ AP1 (Izawa *et al*, 1999).

Le GSH est une molécule majeure dans la réponse cellulaire à un stress oxydant et l'expression des enzymes qui régulent son homéostasie est d'ailleurs modulée par ce stress oxydant. Toutes les régions régulatrices explorées jusqu'à aujourd'hui possèdent des sites de fixation pour le facteur de transcription AP1 qui semble jouer un rôle central dans l'homéostasie du GSH. Les régions régulatrices du gène de la GGT sont pour le moment très mal connues, mais l'analyse de la séquence du promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm I_B a montré la présence de sites AP1 à proximité du site d'initiation de la transcription. Il est probable que les enzymes régulant le taux intracellulaire de GSH soient régulées par des mécanismes similaires et donc que la régulation de l'expression de la GGT implique également des sites AP1.

2.8.2. Régulation de la GGT au cours du développement :

Wapnir *et al*, 1982 ont montré que l'activité GGT du placenta décroît de façon linéaire lors du dernier tiers de la gestation de la rate, au contraire, l'activité rénale augmente de 15 fois pour atteindre son maximum environ 12 jours après la naissance. L'activité GGT cérébrale apparaît à la naissance puis augmente régulièrement pour atteindre son maximum d'activité lors du sevrage. La GGT hépatique quant à elle est maximum pendant la période fœtale, puis décroît de 95 % à l'âge adulte. Baik *et al*, (1992) ont démontré que lors du développement du rein, il y a une démethylation progressive des promoteurs I et II du gène de rat qui pourrait être responsable de la modification du degré d'expression de la GGT.

Chez le rat l'expression dans le poumon apparaît à la naissance et augmente progressivement jusqu'à l'âge adulte (Oakes *et al*, 1997), d'autre part, les auteurs ont montré qu'au stade fœtal et post natal, seules les cellules alvéolaires de type II expriment la GGT, alors que les cellules Clara deviennent le site majeur d'expression de l'ARNm et de la protéine après 2 à 3 semaines ainsi que chez le rat adulte. Palladino *et al*, 1994 ont montré que les ARN de type II, III et IV de rat sont exprimés de façon région spécifique dans l'épididyme et que la régulation de l'expression de ces messagers par la testostérone est également dépendante de la région considérée.

Chez l'homme, la GGT est essentiellement présente au niveau d'organes très actifs dans le transport ou la sécrétion de métabolites, tels que le rein, le pancréas, l'intestin, le foie et le cerveau, ainsi que dans les liquides biologiques (le sérum, la bile et les urines). L'activité tissulaire la plus importante a été mesurée dans le rein adulte. Hanigan *et al*, (1996) développent un anticorps reconnaissant la GGT humaine sur des coupes de tissus. L'étude a révélé que la GGT est exprimée dans un grand nombre de tissus d'origines très différentes. La plus forte réactivité vis à vis de l'anticorps est trouvée à la surface des cellules du tube rénal proximal, dans le canal biliaire hépatique et dans les cellules endothéliales des capillaires à proximité du système nerveux. L'analyse des tissus humains fœtaux montre que l'expression de la GGT varie pendant le développement. Par exemple, l'activité GGT du rein d'un adulte est 20 fois supérieure à celle du rein fœtal

2.8.3. Régulation de l'expression de la GGT par le stress oxydant :

L'étude de la régulation de la GGT dans les cellules épithéliales alvéolaires de rat (Kugelman *et al*, 1994) a montré que cette enzyme est induite par un stress oxydant responsable d'une chute du GSH intracellulaire (traitement par de l'H₂O₂ ou de la menadione). Les auteurs suggèrent que cette réponse adaptative pourrait servir aux cellules à reconstituer leur stock de GSH intracellulaire à partir du GSH circulant. Dans l'épididyme de rat, deux autres ARNm (II et IV) sont induits par des stimuli oxydatifs (ERO) d'environ 70 % (Markey *et al*, 1998).

Plusieurs sites consensus pour AP1, AP2 et un ARE sont localisés dans les séquences proximales des promoteurs de la GGT de rat. La plupart d'entre eux, conservés chez la souris seraient responsables des modifications d'expression de la GGT en réponse à un stress oxydant.

Le niveau d'expression de la GGT humaine est également modulée lors de la réponse cellulaire aux ERO (chapitre 2.2.1.1: propriétés antioxydantes de la GGT). Ces modulations conduisent

généralement à une induction de l'expression de cette enzyme et par conséquent à une augmentation du taux de GSH intracellulaire.

2.8.4. Régulation de l'expression de la GGT par des xénobiotiques :

Le traitement par l'acide *trans*-rétinoïque des lignées cellulaires hématopoïétiques humaines HL60, U937 et K562 provoque une augmentation de l'activité GGT d'un facteur 4 à 6 (El Yaagoubi *et al*, 1995). L'analyse des ARNm dans ces lignées cellulaires montre clairement qu'elles n'expriment que les ARNm de type I (issus du gène I). Le traitement à l'acide rétinoïque induit la différenciation des cellules HL60 en neutrophiles et des cellules U937 en macrophages. Dans ces deux lignées, l'activité GGT est induite lors de la différenciation. Les cellules K562, insensibles à l'action différenciatrice de l'acide rétinoïque ne voient pas leur activité GGT modifiée. Ces données suggèrent que l'induction de l'activité GGT soit liée aux mécanismes de différenciation cellulaire. D'ailleurs, il a été montré que les agents de différenciation de lignées hématopoïétiques U937, HL60 et K562, comme le DMSO, diminuent l'activité GGT alors que les facteurs de croissance comme l'interleukine I l'augmentent. L'interleukine I augmente également l'activité GGT dans les cellules leucémiques KG1 de façon protéine G et protéine kinase C dépendante (Miller *et al*, 1993).

La GGT hépatique est induite par la consommation d'alcool. D'ailleurs, bien que la mesure de l'activité de la GGT sérique soit l'un des marqueurs cliniques utilisés pour le suivi du sevrage alcoolique, les mécanismes par lesquels son activité est augmentée restent inconnus.

Carrière *et al* (1998), travaillent sur les cellules Caco-2 et montrent qu'une surexpression du cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) est responsable d'une modification de l'expression de protéines membranaires associées au transport et au métabolisme du glucose. Ces auteurs ont démontré que des traitements inducteurs du CYP 1A1 sont responsables d'une inhibition de l'expression de la GGT couplée à une augmentation de la consommation du glucose extracellulaire. Les résultats suggèrent que les mécanismes en jeu dépendent soit directement des inducteurs du CYP 1A1, soit des voies de transduction du signal de ce cytochrome. Il y aurait également un lien entre le métabolisme du glucose et la régulation de la GGT.

La méthylation du gène de la GGT peut également être responsable de la modulation de son expression : Yaagoubi *et al*, (1998) étudient l'effet de la 5-azacytidine sur l'expression de la GGT.

Le traitement de cellules LNCap et PC-3 (dérivées de cancers prostatiques) par cet agent diminue le nombre de sites méthylés sur le gène de la GGT de façon dose et temps dépendante. L'activité GGT est inversement corrélée au statut de méthylation du gène suggérant que cela puisse constituer l'un des mécanismes de régulation de cette enzyme.

2.9. Régulation et rôle de la GGT lors de la cancérogenèse

Des études ont montré que les hépatocytes de rat traités par un agent chimique carcinogène ont une activité GGT augmentée et possèdent un avantage prolifératif par rapport à des hépatocytes exprimant plus faiblement la GGT. La GGT est d'ailleurs utilisée en tant que marqueur de lésions néoplasiques dans le foie lors de la cancérogenèse induite par des agents chimiques (Hendrich *et al*, 1987). En effet, le GSH, synthétisé grâce à l'approvisionnement en acides aminés par la GGT, protégerait la cellule des carcinogènes. Warreb *et al*, (1993) ont montré que des cellules tumorales transfectées par le gène de la GGT prolifèrent plus vite que les cellules tumorales parentales lorsqu'elles sont injectées à des souris "nudes". Les auteurs suggèrent d'ailleurs que cette propriété vient de l'avantage que ces tumeurs ont pour leur approvisionnement en cystéine. De la même façon, Obrador *et al* (2002) ont étudié deux populations de cellules de mélanome B 16, présentant un fort (lignée F10) ou un faible (lignée F1) pouvoir métastatique. Ils ont montré que la lignée F10 exprime la GGT à un niveau plus élevé et qu'elle possède également une concentration en GSH intracellulaire 10 fois supérieure à la lignée F1.

Hanigan *et al*, 1999 ont transfecté des cellules de cancer de la prostate PC3 par la GGT et les ont injectés à des souris nues. Ces auteurs ont constaté que non seulement les cellules GGT positives prolifèrent 2 fois plus vite que la lignée parentale, mais qu'en plus ces cellules sont plus résistantes à un traitement anticancéreux au cisplatine.

D'autre part, l'analyse immunochimique de gliomes a montré qu'une forte expression de la GGT se retrouve fréquemment dans les tumeurs de stade avancés, mais jamais dans les tissus sains du cerveau. Parallèlement, la transfection de cellules L9 de gliomes par l'ADNc de la GGT procure à ces cellules un avantage de croissance dans un milieu de culture déficient en cystéine (Schafer *et*

al, 2001). Ainsi, dans plusieurs types de cancers il a été montré que la GGT peut jouer un rôle dans la prolifération tumorale et la réponse aux médicaments anticancéreux. Cependant, le niveau d'expression de la GGT dans les tissus cancéreux est variable. En effet, dans les hépatocarcinomes et les adénocarcinomes du poumon, les taux d'expression de la GGT augmentent (Greengard *et al*, 1986), alors que les cancers du pancréas et du rein sont associés à une diminution de la concentration en GGT par rapport aux tissus sains (Fujiwara *et al*, 1982).

Les variations de la GGT et la quantité de protéines exprimées à la surface des cellules au cours des leucémies, des cancers du pancréas, du foie et du poumon, présentent un intérêt pour l'étude de la régulation de cette enzyme au cours de la différenciation et/ou de la prolifération cellulaire anormale d'autant plus que des études suggèrent l'utilisation de l'expression de sous types spécifiques de la GGT comme marqueurs précoces et spécifiques de certaines pathologies. En effet, Leh *et al* (1996) ont montré que l'ARNm de type III est exprimé dans 50% des cas de leucémies lymphoblastiques aiguës et jamais dans les tissus sains. De même, Tsutsumi *et al* (1996) suggèrent l'utilisation de la détection de l'ARNm I_B pour déceler à un stade précoce les carcinomes hépatiques.

L'organisation génomique complexe de la GGT ne simplifie pas l'étude de sa régulation par différents facteurs. Il apparaît quand même que cette enzyme est régulée lors d'événements variés, et par un grand nombre de xénobiotiques. L'étude de la répartition de ces ARNm spécifiques pourrait même servir de marqueur pour le développement de certaines pathologies, notamment de certains cancers.

Il est donc primordial de décrypter plus précisément, les mécanismes qui gouvernent la régulation de cette enzyme clé dans de nombreuses fonctions cellulaires.

3. Place du glutathion et de la GGT dans la résistance aux traitements anticancéreux par les dérivés du platine :

3.1. Principe de traitement de la pathologie cancéreuse

Avant de décrire la place du GSH et de la GGT dans la réponse cellulaire aux anticancéreux dérivés du platine, il est important de citer rapidement les bases cellulaires et pharmacologiques de ces traitements.

Les médicaments anticancéreux sont des antimétabolites, utilisés seuls ou en association, dans les chimiothérapies qui composent le traitement des cancers. Depuis la découverte du premier agent anticancéreux, l'arsenal thérapeutique s'est développé, et compte maintenant plus d'une cinquantaine de principes actifs qui peuvent être classés en familles en fonction de leur mode d'action.

Les médicaments anticancéreux attaquent les cellules tumorales en prolifération au niveau de différentes cibles. Il existe différents agents qui agissent sur l'ADN cellulaire :

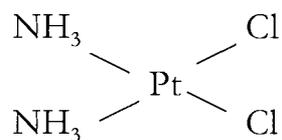
Les agents "alkylants" comme les sels de platine induisent une modification chimique des nucléotides provoquant des pontages intra et interbrin qui empêchent la réplication de l'ADN, ce qui aboutit à la mort de la cellule touchée. Les agents "intercalants" comme les anthracyclines possèdent une structure moléculaire volumineuse qui leur permet de s'insérer entre les bases de l'ADN provoquant une déformation de la structure spatiale qui entravent la réplication de l'ADN. Les agents "scindants" comme la bléomycine entraînent des cassures dans l'ADN. Il existe aussi des médicaments qui agissent sur une ou plusieurs étapes enzymatiques essentielles à la synthèse d'ADN. Les "antimétabolites" comme le méthotrexate se substituent aux composants naturels de l'ADN et leur incorporation bloque la multiplication cellulaire. Les "poisons du fuseau" agissent au niveau de la mitose de deux manières, soit en empêchant la polymérisation des microtubules (comme les alcaloïdes de pervenche), et donc la formation du fuseau mitotique soit en empêchant la dépolymérisation des tubules, et ainsi la division de la cellule.

Les principes d'association de traitements chimiothérapeutiques reposent sur un bénéfice thérapeutique sans majoration des effets indésirables des anticancéreux. Ainsi, dans une chimiothérapie, doivent être associés, des médicaments qui sont actifs individuellement, qui présentent des mécanismes d'action différents, et, qui n'entrent pas en compétition. Les médicaments associés ne doivent pas être sujets aux mêmes mécanismes de résistance, et leurs propres effets secondaires ou toxicités ne doivent pas s'additionner.

3.2. Le cisplatine, Cis diammine dichloroplatine, CDDP

Synthétisés pour la première fois en 1845, les sels de platine n'ont vu leur rôle pharmacologique mis en évidence qu'en 1965. A cette date, Rosenberg, étudie la croissance de bactéries dans un champ électrique et note une inhibition de la réplication d'*E.Coli* lorsqu'il utilise des électrodes de platine. En fait, les sels de platine libérés par électrolyse empêchaient la croissance bactérienne. Premier complexe métallique utilisé dans le traitement du cancer, le CDDP constitue, avec les autres dérivés du platine, une nouvelle classe originale d'agents cytostatiques.

➤ Structure : Cis diammine dichloroplatine, CDDP



Le CDDP est une molécule plane constituée d'un atome de platine (Pt), substitué par 2 atomes labiles de chlore en position *cis*. Son poids moléculaire est de 300,05. La molécule avec une configuration *trans* des atomes de chlore ne montre pas d'activité antiproliférative.

➤ Pharmacocinétique :

Le CDDP est généralement administré par voie intraveineuse (injection ou perfusion), ce qui provoque une augmentation immédiate de la concentration plasmatique. Le pourcentage de liaison du CDDP aux protéines plasmatiques peut atteindre 90 % et cette fraction est inactive.

Suite à l'administration intraveineuse de CDDP, le principe actif est largement distribué dans les tissus et le plasma. La concentration la plus importante est observée au niveau du rein, du foie, des intestins et peut persister jusqu'à 2 à 4 semaines. De même, on peut trouver des concentrations élevées dans d'autres organes tels que les muscles, la vessie, les testicules, la prostate, le pancréas, la rate, les glandes surrénales, le système lymphatique, le thymus, la thyroïde, le cerveau, le cervelet, la vésicule biliaire, les ovaires et l'utérus (d'où les indications privilégiées du CDDP dans les cancers touchant ces organes). Le platine s'accumule dans les tissus suite à l'administration de CDDP et reste détectable jusqu'à 6 mois après la dernière administration. Le platine est aussi détecté dans certaines cellules sanguines circulantes comme les érythrocytes et les lymphocytes.

Les mécanismes du métabolisme du CDDP sont encore mal connus. 25 à 75% du CDDP administré est excrété dans les urines. L'élimination se fait par filtration glomérulaire, mais le CDDP peut aussi subir des phénomènes de sécrétion et de réabsorption au niveau tubulaire qui feront varier le taux de son élimination. Une faible proportion de CDDP est éliminée via la bile et la salive. Après administration de CDDP, 15 à 30% de la dose administrée sont excrétées dans les urines durant les 2 à 4 premières heures et 20 à 80% de la dose administrée éliminée dans les 24 premières heures. Chez un sujet adulte sain, la demi-vie plasmatique du CDDP est très variable (de 2 à 72 heures).

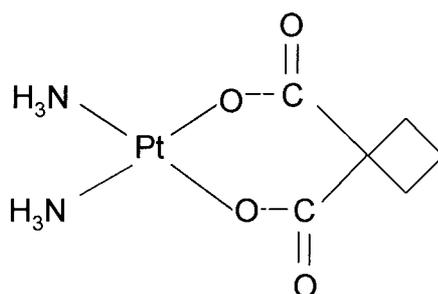
➤ **Indications thérapeutiques :**

Le CDDP est l'un des agents chimiothérapeutiques les plus utilisés pour le traitement de tumeurs solides. Il est particulièrement actif pour les cancers de la sphère génito-urinaire (testicules, ovaires, col de l'utérus, vessie, uretère), les cancers du sein, du poumon, de la tête et du cou. Lors de ces traitements, le CDDP est souvent associé à d'autres anticancéreux.

3.3. Le carboplatine

Les effets secondaires du CDDP et notamment sa néphrotoxicité importante ont conduit au développement de molécules dérivées du CDDP. Le carboplatine est l'un des composés utilisés en chimiothérapie qui a le même mode d'action que le CDDP mais une pharmacocinétique différente et il est beaucoup moins toxique pour le rein.

➤ **Structure :**



Le carboplatine possède deux groupements carboxyle ester à la place des atomes de chlore. Ces groupes sont plus difficilement déplacés, expliquant la nécessité d'utiliser des concentrations plus fortes que le cisplatine, mais aussi leur moindre toxicité rénale et neurologique.

➤ **Pharmacocinétique :**

Ce composé est peu métabolisé et son élimination se fait par voie rénale par filtration glomérulaire. Le groupement carboxyle stable permet à cet agent de se lier de façon beaucoup moins importante aux protéines que le CDDP (25 % se retrouve sous forme liée).

Kern *et al*, (2001) ont étudié la pharmacocinétique du carboplatine chez des patients atteints de cancer du poumon traités par ce composé en association avec du paclitaxel/docetaxel. Ils ont montré que l'élimination du composé est biphasique, mais extrêmement variable en fonction des personnes. La demi-vie d'élimination moyenne est de 13,6 heures mais l'âge et la fonction rénale sont des facteurs à prendre en compte pour le choix de la posologie.

➤ **Indications thérapeutiques :**

Ce composé est principalement utilisé pour le traitement des cancers de l'ovaire, de l'utérus, du poumon et de la vessie. Le carboplatine est le plus souvent utilisé en association avec un autre

anticancéreux. Le traitement par le carboplatine est souvent préféré à celui par le CDDP à cause de sa moindre cytotoxicité rénale.

3.3.1. Mode d'action des dérivés du platine

Le CDDP et le carboplatine agissent de façon indépendante du cycle cellulaire mais principalement sur les cellules à activité mitotique importante, que sont les cellules tumorales, les cellules de la peau, du tractus gastrointestinal et de la moelle osseuse. Ces cellules seront donc plus sensibles à la cytotoxicité de ces agents. Le CDDP est administré par voie intraveineuse, et lorsqu'il circule dans le sang où la concentration en chlore est élevée (100 mM), il reste coordonné à ses ligands Cl. Quand il pénètre dans la cellule où, la concentration passe à 4 mM, les atomes de chlore sont remplacés par des molécules d'eau, ce qui génère des espèces cationiques qui vont réagir avec les sites nucléophiles des protéines, de l'ARN et de l'ADN. La formation des adduits CDDP/ADN entraîne une inhibition de la transcription et de la réplication qui peut entraîner l'arrêt en phase G2 ou la mort cellulaire (Figure 15).

Pour le carboplatine, le mode d'action est le même, c'est l'interaction de la forme active avec l'ADN qui est responsable de la toxicité de l'agent. La seule différence est la réactivité du carboplatine qui est inférieure à celle du CDDP.

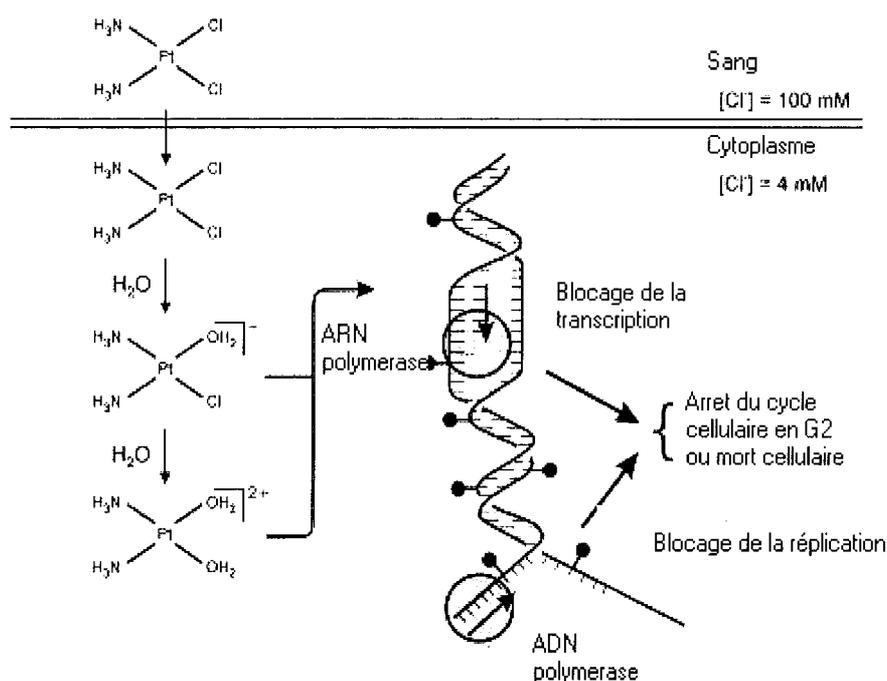


Figure 15 : Mécanismes d'action du CDDP. D'après Kartalou *et al*, (2001) A

Structure des adduits ADN-CDDP :

La formation d'adduits entre le CDDP et l'ADN est un mécanisme clé de la cytotoxicité du CDDP. Le CDDP forme approximativement 65 % de liaisons intrabrin 1,2-d(GpG), 25 % 1,2-d(ApG), et 5 à 10 % de 1,3-d(GpNpG) (Figure 16) et un faible pourcentage de liaisons interbrin et d'adduits monofonctionnels.

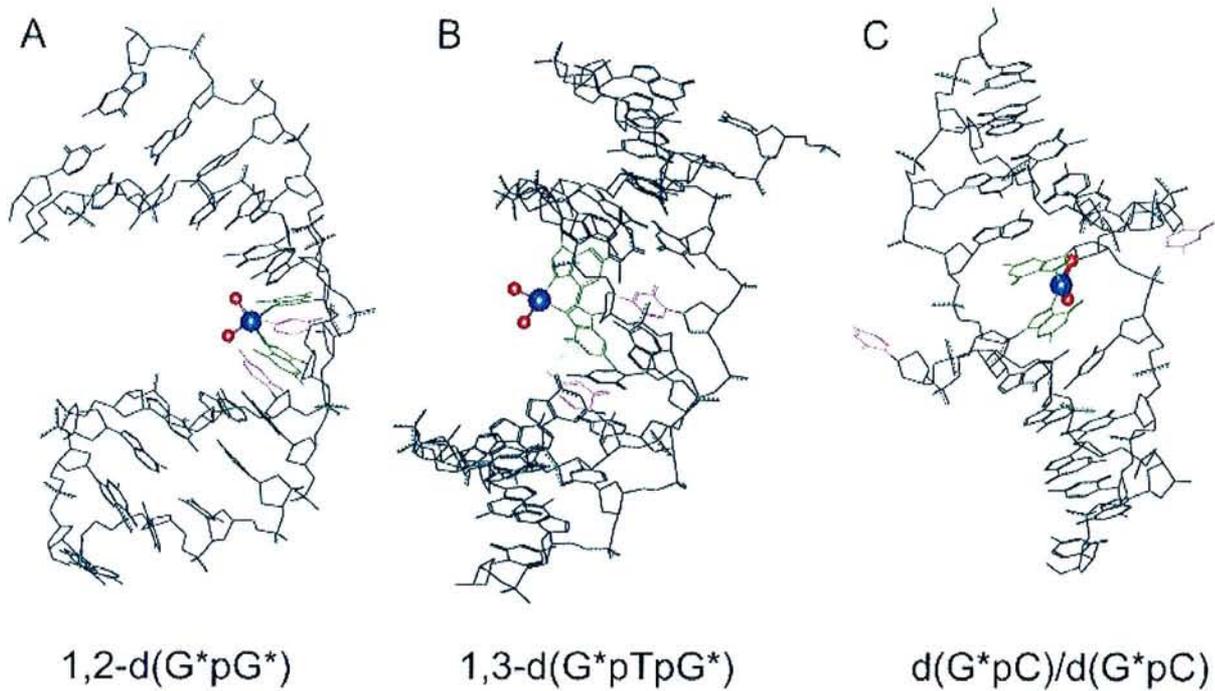


Figure 16 : Structure des différents adduits CDDP-ADN D'après Kartalou *et al*, (2001) B.

Génération d'ERO lors d'un traitement par le CDDP :

Il a été suggéré que la production d'ERO qui accompagne parfois un traitement par le CDDP pouvait être un des mécanismes engendrant une cytotoxicité. En effet, Masuda *et al* (1994) ont montré que *in vitro*, dans un système acellulaire, le CDDP interagit avec l'ADN en formant des ERO. De même, Sodhi et Gupta (1986) ont montré que des macrophages murins traités au CDDP montrent une production et une sécrétion accrue d'ERO et d'H₂O₂. Cette production d'un stress oxydant suite à un traitement au CDDP a également été mis en évidence par Sasada *et al*, (1996) dans la lignée Jurkat. Les auteurs ont également démontré que la transfection de ces cellules par le gène de la thioredoxine diminue leur sensibilité à cet agent. Les mécanismes générant ces ERO ne sont pas connus mais sont souvent tenus responsables d'une partie de l'effet cytotoxique du CDDP, ainsi que de la néphrotoxicité de ce médicament. Cependant, une

étude récente (Senturken *et al*, 2002) a montré que le traitement de lymphocytes B par le CDDP induit l'apoptose sans générer d'ERO. Ces auteurs suggèrent que les ERO détectés dans les autres études pourraient provenir d'un mécanisme indirect lié au métabolisme du composé et à la réponse cellulaire (induction des oxydases comme la NADPH oxydase).

3.4. Les mécanismes de résistance aux dérivés du platine

D'après Kartalou *et al* (2001).

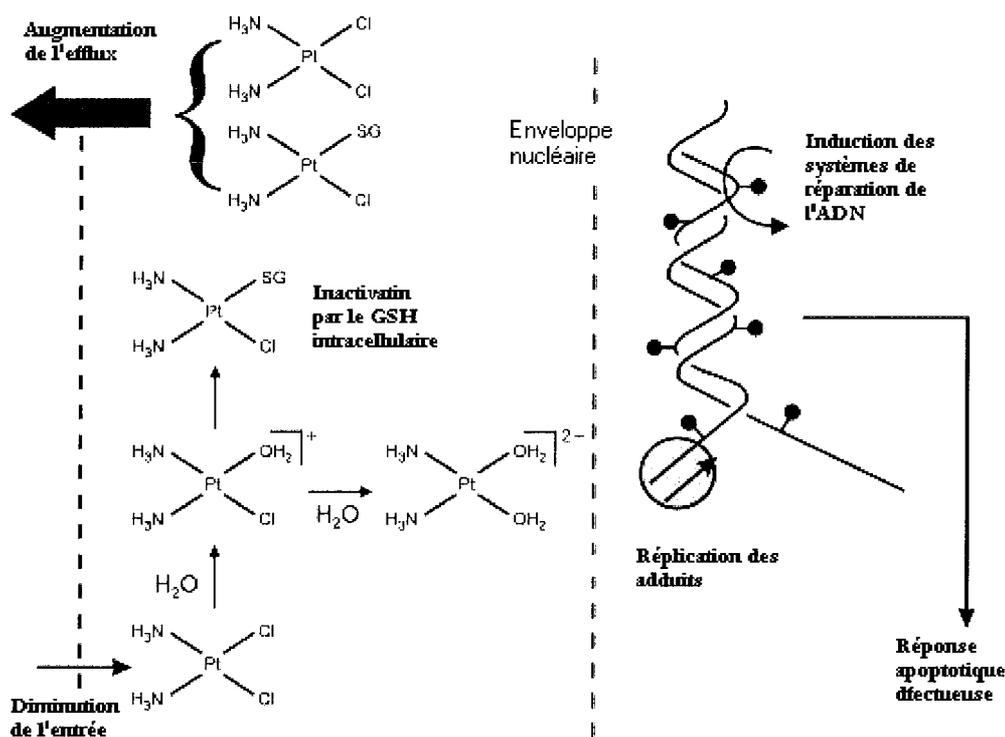


Figure 17 : Mécanismes de résistance au CDDP

3.4.1. Mécanismes généraux :

L'émergence de résistances intrinsèques ou acquises est un frein à l'utilisation des dérivés du CDDP. Les mécanismes d'action de ces composés n'étant pas complètement élucidés, il est très difficile de contrôler ces résistances d'autant plus qu'elles sont le plus souvent

multifactorielles. En effet, de nombreux paramètres peuvent intervenir dans la réponse cellulaire aux médicaments anticancéreux :

3.4.1.1. Le taux import /export

Dans les lignées cellulaires résistantes, il apparaît parfois une diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament qui peut provenir de la diminution de l'import ou de l'augmentation de l'export. A ce jour, le mécanisme exact par lequel le CDDP pénètre dans la cellule n'est pas entièrement élucidé. Le facteur limitant est sa concentration extracellulaire et l'utilisation d'analogues n'entraîne pas de compétition, ce qui suggère que le CDDP entre dans la cellule par un mécanisme passif (diffusion). Par ailleurs une augmentation de la concentration intracellulaire et donc de la cytotoxicité est obtenue lorsqu'on fluidifie la membrane par hyperthermie (Goffoli *et al*, 1989). Cependant, il existe quelques indications montrant que l'entrée du CDDP dans la cellule est également médiée par des protéines membranaires. Par exemple, certaines aldéhydes inhibent l'entrée du CDDP dans la cellule, probablement en formant des bases de Schiff avec les protéines membranaires. Dans une lignée résistante où l'accumulation du CDDP a été trouvée diminuée, il a été montré qu'une protéine membranaire de 48 kDa était exprimée à un taux inférieur à celui de la lignée sensible. Gately et Howell (1993) proposent que 50 % du transport se fasse par voie passive, mais qu'il existerait aussi un mécanisme de diffusion facilitée via une pompe qui n'a pas encore été identifiée.

L'export du médicament à l'extérieur de la cellule est aussi impliqué dans la résistance au CDDP : le CDDP n'est pas un substrat pour la glycoprotéine P (produit du gène *mdr*, multi drug resistance) qui est surexprimée dans certaines cellules résistantes et fonctionne comme une pompe. Par contre, certaines cellules résistantes au CDDP et montrant une diminution de l'accumulation du médicament surexpriment une protéine de 200 kDa qui pourrait être impliquée dans l'efflux du CDDP (Kawai *et al*, 1990). La pompe ATP dépendante pour les conjugués au GSH (pompe GS-X) peut exporter le CDDP conjugué au GSH et pourrait être impliquée dans la diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament dans les cellules résistantes.

3.4.1.2. Rôle des protéines de régulation :

L'altération de l'expression d'oncogènes (comme *c-fos*, *c-myc*, *H-ras*, et *c-abl*) et du gène suppresseur de tumeur (p53) est aussi impliquée dans la résistance au CDDP. Une modulation de l'expression de ces gènes peut avoir de multiples conséquences sur l'homéostasie cellulaire et les mécanismes de résistance liés à ces facteurs de régulation sont difficiles à étudier.

Rôle de cFos dans la résistance au CDDP :

Le gène *c-fos* code pour la protéine cFos qui induit la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la réplication, de la différenciation et de la progression dans le cycle cellulaire. Pour se faire, il interagit avec des membres de la famille de cJun et ATF/CREB.

L'expression de *c-fos* est augmentée dans certaines lignées résistantes et dans des cellules de patients n'ayant pas répondu à une chimiothérapie au CDDP (Scanlon *et al*, 1989). Une inhibition de l'expression de *c-fos* par un ARN antisens à l'ARNm correspondant ou par l'utilisation du ribosyme fos (ARN catalytique clivant l'ARN cFos) restaure la sensibilité au CDDP (Funato *et al*, 1997). cFos va moduler l'expression de gènes sous le contrôle du domaine de liaison à AP1 comme *c-myc*, les métallothionéines, l'ADN polymérase β et ERCC-1 qui sont des protéines impliquées dans certains mécanismes de résistance au CDDP. Un prétraitement avec la cyclosporine A qui inhibe l'expression de *c-fos*, supprime l'induction de ERCC-1 et de l'ADN polymérase β et restaure la sensibilité des cellules au CDDP (Li *et al*, 1999).

Moorehead *et al*, (2000) ont étudié l'effet d'une surexpression de *c-fos* sur la sensibilité au CDDP d'une lignée de carcinome ovarien. Ces auteurs ont montré que les cellules surexprimant cFos sont plus résistantes au CDDP que la lignée parentale. Ils ont également étudié l'expression de *c-fos* dans une lignée rendue résistante et ont montré que le taux basal de cette protéine n'est pas significativement différent. Par contre, après un traitement au CDDP, l'inductibilité de cFos est bien supérieure dans la lignée résistante par rapport à la lignée parentale sensible.

Rôle de cJun dans la résistance au CDDP :

Le CDDP active la JNK kinase (c-Jun-N-terminal protein kinase) qui induit l'expression de *c-jun* (Hayakawa *et al*, 1999). Certaines lignées résistantes expriment de haut niveau en cJun, et une inhibition de cette protéine par l'utilisation de l'herbimicine A restaure la sensibilité en diminuant la réparation de l'ADN via ERCC-1 (Li *et al*, 1999). c-Jun serait donc impliqué dans la résistance au CDDP via la réparation de l'ADN. Yao *et al*, (1995) ont travaillé sur des lignées de cancer ovarien, et ont montré que le degré de résistance était corrélé avec le taux de messagers pour c-Jun et pour la γ GCS. Les auteurs ont suggéré que l'induction de la γ GCS via le facteur de transcription AP1 composé de c-Jun soit l'un des mécanismes impliqués dans la résistance au CDDP. La même équipe a montré que l'utilisation d'un ARNm antisens dirigé contre le messenger

de cJun peut restaurer la sensibilité de la lignée résistante, en parallèle, le taux de messager pour la γ GCS et le taux de GSH intracellulaire sont diminués (Pan *et al*, 2002). Cependant des cellules dérivées de souris “knock out” pour *c-jun* montrent une plus grande résistance au CDDP (Sanchez *et al*, 1999). De même, Zhao *et al* (1995) ont développé une lignée de mélanome résistante au CDDP qui présente un taux de messager pour cJun beaucoup plus faible que dans la lignée parentale. Ces auteurs suggèrent que cJun soit impliqué dans la voie apoptotique de réponse aux dommages sur l’ADN et qu’une diminution de l’expression de cette protéine résulte en une inhibition de l’apoptose. Ainsi, cJun semble jouer un rôle important dans la réponse cellulaire au CDDP, mais par des voies complexes et variées, dépendante de la lignée cellulaire. La mesure de ce paramètre ne peut donc pas être utilisée pour prédire la réponse cellulaire à un traitement par le CDDP.

Rôle de P53 dans la résistance au CDDP

Le gène *p53* (supresseur de tumeurs) est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l’ADN, et l’apoptose. Il est responsable de l’arrêt du cycle en phase G1 ou G2 suite à des lésions à l’ADN, ce qui permet à la cellule de mettre en place les mécanismes de réparation de l’ADN. Un déficit en p53 peut avoir des effets multiples sur la réponse au CDDP. Fan *et al*, (1994) ont montré que des cellules ovariennes de lymphome ou de poumon mutées pour p53 sont plus résistantes au CDDP, probablement à cause de l’inactivation de la voie apoptotique p53 dépendante. p53 est muté (et donc inactif) dans 83 % d’échantillons issus de cancers ovariens n’ayant pas répondu au CDDP (Sato *et al*, 1999). Paradoxalement, des fibroblastes de souris p53 - /-, sont plus sensibles au CDDP, de même, une inactivation de p53 dans des cellules de cancer de la peau, du sein ou du colon les sensibilise à cet agent (Hawkins *et al*, 1996). Ces cellules ne sont peut être pas sensibles à la voie apoptotique liées à p53 et leur sensibilité proviendrait des lacunes dans les voies de réparation de l’ADN dépendant de p53. Il y a donc des contradictions concernant les liens entre p53 et la résistance ou la sensibilité au CDDP, les effets sont à considérés en fonction de la lignée cellulaire.

3.4.1.3. Rôle des mécanismes de réparation de l'ADN :

Il existe différents systèmes de réparation de l'ADN qui peuvent être induits lors de certaines résistances et participer à l'élimination des adduits entre les dérivés du platine et l'ADN.

Rôle du système NER :

Le système NER (nucleotide excision repair) reconnaît les lésions sur l'ADN, il clive l'ADN au niveau de l'adduit et répare les mésappariements. C'est probablement le principal système de réparation de ces adduits. *In vitro*, un plasmide modifié par le CDDP est un substrat pour l'exonuclease Uvr(A)BC qui reconnaît et coupe les lésions sur l'ADN (Beck *et al*, 1985). Des mutants pour des protéines de ce système (*uvr A, B* ou *C*) sont plus sensibles au CDDP. ERCC1 est une endonucléase du NER qui va cliver l'ADN en 5' des lésions sur l'ADN. Des cellules ovariennes de hamster déficientes en ERCC1 (ERCC1 -/-) transformées avec le gène *ERCC1* humain deviennent 5 fois plus résistantes que les cellules ERCC1 -/- (Lee *et al*, 1993). Des taux d'ARNm pour ERCC1 supérieurs ont été détectés dans des tumeurs résistantes au CDDP (Dabholkar *et al*, 1994). Li *et al* (1999) ont montré que le CDDP induit l'expression de cette protéine dans une lignée ovarienne de façon précoce et importante. Cette induction est due à une augmentation de la transcription ainsi qu'à une stabilisation de l'ARNm. Il a été montré *in vitro* que ces systèmes de réparation sont beaucoup plus efficaces sur les adduits intrabrins 1.3d(GpG) que sur les adduits 1.2 d(ApG). Par contre, une réparation des liens interbrins n'a pas été détectée (Moggs *et al*, 1997).

Rôle du système de réparation des bases mal appariées (Mismatch repair) :

Le système Mismatch Repair pourrait, par son mécanisme d'action contribuer à l'action cytotoxique du CDDP

La réplication de l'ADN entraîne un mésappariement au niveau de l'adduit qui va être reconnu par le système "Mismatch Repair" constitué des protéines hMutL et hMutS. Cependant, le complexe ne peut pas corriger le mésappariement à cause du platine. Le brin d'ADN nouvellement synthétisé est alors dégradé et la liaison sur la matrice n'est pas excisée. Il se passe en fait une série de cycles "futiles" de réplication et réparation qui vont aboutir à la formation de coupures de l'ADN et d'incorporation de mutations qui vont entraîner l'arrêt du cycle cellulaire

en G2, ou l'entrée en apoptose. Les mésappariements liés à la platination de l'ADN vont induire le système Mismatch Repair. Des lignées résistantes isolées après des incubations répétées avec du CDDP acquièrent le phénotype "mutator" associé à un défaut du système Mismatch Repair souvent muté dans le gène *hMLH1* (Drummond *et al*, 1996). En effet, une étude sur des échantillons de cancers ovariens avant et après traitement, montre une augmentation de la proportion de cellules déficientes en hMLH1 après exposition au CDDP (Brown *et al*, 1997).

3.4.1.4. Rôle de la tolérance aux adduits CDDP-ADN

Lors de réplication :

Une étude sur un panel de cancers ovariens traités ou non au CDDP a révélé une corrélation inverse entre la tolérance des adduits et la sensibilité à l'agent (Johnson *et al*, 1997). L'augmentation de la tolérance est corrélée avec une facilité pour la réplication malgré les adduits. Il est possible que le Mismatch Repair soit impliqué dans la réplication de ces adduits. La réplication *in vitro* des adduits a été étudiée par différentes polymérases. Leur habilité à transcrire les adduits est plus ou moins forte et dépend du type d'adduits (Comess *et al*, 1992).

Lors de l'apoptose :

La tolérance des adduits peut également inhiber l'apoptose : certaines lignées de cancers d'ovaires ou de lymphome résistantes doivent être traitées par de plus fortes doses de CDDP pour induire l'apoptose. Par exemple, Le CDDP induit une voie apoptotique via la JNK et la p38 MAP kinase, qui n'est pas mise en place dans une lignée ovarienne résistante (Gebauer *et al*, 2000). Une altération de l'expression des régulateurs de l'apoptose peut jouer sur la sensibilité cellulaire au CDDP : une inhibition de Bax (qui est un promoteur de l'apoptose) est observée dans certaines lignées de cancers ovariens résistantes (Perego *et al*, 1996). Au contraire, une transfection des cellules par Bcl-2 ou BclX_L, qui inhibent l'apoptose conduit à une plus grande résistance au CDDP.

3.4.1.5. Inactivation du CDDP par des molécules contenant un atome de soufre

Rôle des métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines riches en cystéines impliquées dans l'homéostasie du Zn^{2+} et la détoxification des métaux lourds comme le cadmium. Elles peuvent se lier au CDDP dans un ratio protéines-CDDP 1:10 et peuvent affecter la sensibilité des cellules à ce traitement (Pattanaik *et al*, 1992). Des cellules résistantes au cadmium et montrant une augmentation de l'expression des métallothionéines, présentent une résistance croisée avec le CDDP (Andrews *et al*, 1987). Cependant, l'analyse du contenu en métallothionéines avant et après une chimiothérapie au CDDP dans des échantillons de cancers ovariens a montré que ce n'était pas un déterminant majeur de la réponse cellulaire au CDDP (Murphy *et al*, 1991). Ce paramètre ne peut pas être à lui seul utilisé pour prédire la réponse à la thérapie.

Rôles des thioredoxines (TRX)

La thioredoxine (TRX) est une protéine ubiquitaire qui contient un groupement thiol actif et qui, comme le GSH, intervient dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant et le maintien du statut redox des protéines. Elle intervient notamment dans l'activation de certaines enzymes, la régulation redox de certains facteurs de transcription, transporteurs, et récepteurs. Nakamura *et al*, (2000) ont montré que des cellules de cancer pancréatique résistantes au CDDP possédaient un taux de TRX supérieur à celui des lignées parentales sensibles. L'introduction d'un ARN antisens à la TRX restaure la sensibilité au CDDP ainsi qu'à d'autres agents générateurs d'un stress oxydant. Sasada *et al*, 1996 ont montré que le CDDP induisait l'expression et l'activité de la TRX de façon dose dépendante dans les cellules Jurkat. Cette induction passe par une augmentation de la transactivation du promoteur qui est inhibée en présence d'agents antioxydants. Ces données suggèrent que le stress oxydant généré par le CDDP soit responsable de l'induction de la TRX et que son rôle serait d'éliminer ces ERO et/ou d'inactiver le CDDP par une interaction directe *via* son groupement thiol. Cependant, Yamada *et al*, (1997) ont établi une lignée ovarienne A 2780 surexprimant la TRX qui possède une résistance accrue au stress oxydant généré par H_2O_2 , mais pas au CDDP. Une lignée cellulaire HeLa résistante au CDDP montre une activité TRX augmentée ainsi qu'une plus grande sécrétion de la protéine dans le

milieu extracellulaire. L'addition de TRX dans le milieu extracellulaire des cellules parentales HeLa augmente leur résistance au CDDP ainsi que leur capacité à récupérer la cystéine extracellulaire et donc leur GSH intracellulaire (Sasada *et al*, 2000).

Arner *et al*, (2001) ont démontré que le CDDP, ainsi que son métabolite couplé au GSH (GS-CDDP) inhibent de façon irréversible l'activité TRX, probablement en se fixant à une des cystéines du site actif de l'enzyme.

3.4.2. Mécanismes liés aux enzymes du GSH

3.4.2.1. Taux intracellulaire de GSH et résistance au CDDP

Etant donnée l'importance du GSH dans les mécanismes de défense cellulaire, de nombreuses équipes se sont penchées sur son rôle dans la réponse au CDDP. Des lignées ovariennes rendues résistantes par des expositions répétées au CDDP ont été analysées pour leur contenu en GSH intracellulaire (Godwin *et al*, 1992). Les auteurs ont clairement démontré une corrélation directe entre le degré de résistance des différentes lignées et leur contenu en GSH intracellulaire. De plus, en diminuant le pool intracellulaire de GSH par l'utilisation de BSO (inhibiteur de la γ GCS), il est possible d'augmenter la cytotoxicité du CDDP dans différentes lignées cellulaires (Pendyala *et al*, 1997).

Newkirk *et al*, (1997) ont travaillé sur des lignées cellulaires dérivées de cancers de la tête et du cou et ils ont mis en évidence une corrélation directe entre la résistance au CDDP et le contenu intracellulaire en GSH dans ces cellules. Là encore, un traitement par le BSO sensibilise les cellules au CDDP. Par contre, l'analyse du taux de l'ARNm de la γ GCS n'a montré aucune corrélation entre le degré d'expression de cette enzyme et la résistance au CDDP.

Nagata *et al* (2001), ont utilisé un ribozyme dirigé contre l'ARNm de la γ GCS dans une lignée HCT8 résistante au CDDP qui a un taux de GSH intracellulaire supérieur à celui de la lignée parentale résistante. Lorsqu'elle est transfectée par un vecteur exprimant le ribozyme, le taux de GSH intracellulaire diminue, et la lignée redevient sensible.

3.4.2.2. Rôle de la pompe aux conjugués du GSH : GS-X

Le transport actif des médicaments hors de la cellule est l'un des mécanismes de résistance. La pompe GS-X est une pompe d'export ATP dépendante pour les anions organiques comme les

leucotriènes cystéinyl, le GSSG, les conjugués au GSH, aux glucuronides. Cette pompe est codée par le gène MRP.

Ishikawa et Ali-Osman (1993), sont les premiers à s'intéresser à la caractérisation des adduits entre le GSH et le CDDP. Ils mettent en évidence la formation *in vitro* d'un adduit de stœchiométrie 1/2 (CDDP/GSH) et caractérisent sa structure par spectrométrie de masse. Les mêmes auteurs démontrent l'existence de cet adduit dans des cellules de leucémie traitées au CDDP : le traitement au CDDP induit une augmentation du contenu intracellulaire en GSH (5 fois), et les adduits GSH-CDDP correspondent à 60 % du contenu intracellulaire en platine total. Ces données suggèrent fortement que le mécanisme principal de détoxification du CDDP passe par la formation de ces adduits.

Afin de déterminer les mécanismes de transport de ces adduits, es auteurs ont préparé des vésicules membranaires des cellules de leucémies. Ils ont montré que l'accumulation des adduits marqués dans ces vésicules est active et stimulée par la présence d'ATP. Elle dépend également de l'osmolarité du milieu. D'autre part, un traitement par l'acivicine (inhibiteur de la GGT) ne modifie pas la radioactivité mesurée, ce qui prouve que l'on mesure bien l'adduit GSH-CDDP, et pas son produit de dégradation par la GGT. Le transport de ces adduits, est inhibé par des substrats de la pompe GS-X comme les LTC4 et le glutathion réduit GSSG, mais pas par les inhibiteurs de la glycoprotéine P.

Dans une étude précédente sur la distribution subcellulaire du CDDP dans le foie et le rein, Sharma et Edwards (1983) avaient montré que la majeure partie du platine cytosolique était présent sous forme de molécules de faible poids moléculaire (<1000), mais la nature de ces complexes n'était pas clarifiée. Il pourrait très bien s'agir d'adduits entre le GSH et le CDDP.

En 1996, Ishikawa *et al*, étudient le rôle de la pompe GS-X dans les mécanismes de résistance au CDDP. Ils utilisent une lignée HL60 leucémique résistante au CDDP qui surexprime la pompe GS-X (4 à 5 fois par rapport à la lignée sensible) et montre un taux de GSH intracellulaire augmenté. Lorsque les cellules résistantes ne sont pas exposées au CDDP pendant un mois, le taux d'ARNm pour la pompe diminue ainsi que son activité de même pour le taux d'ARNm de la γ GCS et le taux de GSH intracellulaire. Par contre, au contact du CDDP, l'induction de l'expression de la pompe , de la γ GCS et du taux de GSH intracellulaire est immédiate pour les cellules résistantes. Les auteurs suggèrent que la pompe GS-X et la γ GCS sont induites de façon

coordonnée dans cette lignée cellulaire, et que ce mécanisme est responsable de la résistance au CDDP.

3.4.2.3. Etudes cliniques sur les enzymes du GSH dans la résistance

au CDDP :

Etant donnés les rôles centraux des enzymes du métabolisme du GSH dans le développement de résistances au CDDP, il a été suggéré que l'étude de l'expression de ces enzymes pourrait apporter une information prédictive sur l'efficacité d'un traitement au CDDP. Des études ont alors été menées sur des échantillons de patients ayant répondu ou non à ce traitement afin d'établir une éventuelle relation entre le taux d'expression de ces enzymes et la réponse à la chimiothérapie.

Une étude sur des lignées de mélanomes utilisant des cellules non cancéreuses comme témoin a révélé que le taux de GSH, GST, GGT et GR varie d'une lignée à l'autre de manière indépendante et sans lien avec le statut (cellules saines, cellules tumorales et cellules de métastase). Cependant, les résultats n'ont pas été corrélés avec la réponse à une chimiothérapie (Schadendorf *et al*, 1995).

Tew *et al*, (1996) ont utilisé les cellules du " National Cancer Institute Drug Screening Program " pour étudier le statut des enzymes associées au GSH dans différents types de cancers. Les auteurs ont démontré que le statut de ces enzymes est très lié au type de tissu considéré et qu'il est extrêmement difficile de faire ressortir des corrélations statistiques entre les différents paramètres étudiés. Les résultats les plus marquants concernent la famille des GST qui sont souvent surexprimées dans les lignées cellulaires cancéreuses et suite à des traitements chimiothérapeutiques. De même, les résistances à des agents alkylants (comme le CDDP) sont corrélées de façon positive avec certains paramètres comme le taux de γ GCS et le niveau d'expression de la GSTP1.

Tanner *et al* (1997), se sont penchés sur la résistance de lignées de cancers ovariens à un dérivé du CDDP : le carboplatine. Il apparaît que les patientes ont une meilleure espérance de vie si la tumeur est relativement pauvre en GSH. Cependant, l'analyse seule du GSH intracellulaire n'est pas un facteur fiable pour le pronostic clinique. Le taux de GSH intracellulaire semble être corrélé à l'évolution de la maladie vers des stades plus avancés, mais pas à la réponse au

carboplatine. De même, ces auteurs n'ont pas décelé de corrélation entre le taux de GST et l'évolution de la maladie ou la réponse au carboplatine.

Nishimura *et al*, (1998) ont utilisé des échantillons de cancers de la tête et du cou qui sont le plus souvent traités par le CDDP en association avec le 5FU. Ce traitement est particulièrement efficace chez les patients diagnostiqués de façon précoce. En revanche, des patients traités plus tardivement répondent beaucoup moins bien. Les auteurs ont donc étudié chez ces patients ne répondant pas bien au CDDP l'expression de la GGT, de la GST, et de la γ GCS. Ils ont montré que le taux d'expression de la GGT s'étend sur une grande échelle de valeurs et ne peut pas vraiment être corrélé avec la réponse au CDDP. Il en est de même pour la γ GCS par contre, il apparaît que les patients ayant une faible activité GST répondent mieux à la chimiothérapie, et ce, avec un bon coefficient de corrélation.

Hanigan *et al*, (1998) étudient le rôle de la GGT dans la réponse au CDDP de cellules de cancers ovariens. Les cellules saines de l'épithélium ovarien n'expriment pas la GGT à leur surface, alors que les cellules cancéreuses l'expriment à différents degrés (Hanigan *et al*, 1994). Les auteurs ont montré une corrélation entre le degré d'expression de la GGT et le temps de survie des patientes qui est plus long si l'expression de la GGT est faible. Ces résultats suggèrent que la GGT pourrait avoir un rôle dans la réponse à la chimiothérapie par le CDDP.

En conclusion, il est clair que les mécanismes de résistance au CDDP sont multiples, complexes, difficiles à décortiquer et à étudier. L'utilisation de lignées cellulaires rendues résistantes après plusieurs passages en présence de cet agent a permis de faire de grandes avancées sur la compréhension des mécanismes mis en jeu, notamment sur le rôle des enzymes associées au GSH. Cependant, l'application concrète de ces découvertes pour le diagnostic de survie ou de réponse à un traitement chimiothérapeutique n'est pas encore envisageable ou doit être accompagnée d'autres tests.

D'autre part, l'établissement de lignées cellulaires résistantes au CDDP entraîne la modification de nombreux paramètres cellulaires, et il est très difficile d'apprécier le rôle d'un facteur en particulier. C'est pourquoi, l'utilisation de lignées isogéniques (surexprimant un seul gène) peut être un outil de choix.

OBJECTIFS

Comme nous l'avons vu lors de la mise au point bibliographique, l'étude de l'organisation et de la régulation de la GGT humaine laisse encore de nombreux points à éclaircir. En effet, les travaux précédents laissent présager l'existence de mécanismes complexes variés pour le contrôle de l'expression de cette enzyme. Pourtant, la GGT occupe une place importante dans les fonctions physiologiques et notamment dans le métabolisme du GSH, principale molécule de défense contre le stress oxydant et les xénobiotiques. De plus, son expression est modulée lors du développement de certaines tumeurs ainsi que dans des lignées cancéreuses résistantes au cisplatine.

Il nous paraît alors important de mieux cerner les mécanismes de régulation et d'expression de la GGT, ainsi que les conséquences de sa surexpression au niveau par exemple, de la réponse aux anticancéreux dérivés du platine.

La premier objectif de ce travail sera d'étudier les mécanismes de régulation de la GGT et d'apporter de nouvelles informations et des précisions sur la régulation de l'expression du gène I humain.

Plus précisément, nos objectifs spécifiques sont :

- Etudier l'expression et la régulation des 3 ARNm issus du gène I humain, (seul gène codant pour une protéine active) dans 4 lignées cellulaires après traitement par du TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate), du NaBu (butyrate de sodium), ou du TNF α (tumor necrosis factor α).
- Nous approfondirons ensuite cette étude en nous penchant sur la régulation spécifique du promoteur B (dirigeant la transcription de l'ARNm I_B). Ce promoteur est le seul qui à été décrit jusqu'à présent sur le gène I de la GGT humaine. Nous nous focaliserons sur la régulation de ce promoteur par le facteur de transcription AP1. Par des expériences de transfections transitoires et de retardement sur gel, nous étudierons le rôle des séquences proximales (en amont du site +1 d'initiation de la transcription) sur la régulation de l'ARNm I_B par le TPA dans les cellules HeLa et HepG2.

- L'origine des 3 messagers issus du gène I ne peut pas s'expliquer uniquement par des épissages alternatifs, et il est fort probable qu'ils soient initiés à partir de promoteurs indépendants, comme c'est le cas chez le rat et la souris. Nous nous attacherons donc à localiser et à caractériser un nouveau promoteur sur le gène I humain, celui qui pourrait diriger la transcription de l'ARNm I_C.

En répondant à ces 3 objectifs, et en essayant de corréler les résultats de ces 3 parties, nous espérons être en mesure d'apporter des indications nouvelles et plus précises sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la GGT humaine.

Les mécanismes de résistance aux anticancéreux sont multifactoriels et complexes. L'utilisation de lignées cellulaires isolées après des expositions répétées à un médicament ne permet pas d'évaluer la part d'un paramètre précis sur le développement des résistances. Les études utilisant ces lignées ont néanmoins permis de comprendre que le GSH et les enzymes qui lui sont associées tiennent une place centrale dans la défense cellulaire contre les dérivés du platine. La GGT est quelquefois induite dans certaines lignées cancéreuses, et notamment dans les lignées résistantes au CDDP. Nous avons donc voulu déterminer quel peut être le rôle de la GGT dans la réponse cellulaire au CDDP et au carboplatine.

La 2^{ème} partie de ce travail sera consacrée à l'étude de l'effet d'une surexpression de la GGT sur la réponse cellulaire au cisplatine et au carboplatine.

- Pour cette étude, nous avons tout d'abord établi un couple de lignées cellulaires différentes par leur niveau d'expression de l'enzyme : les lignées HeLa (présentant une faible activité GGT), et HeLa-GGT (cellules transfectées de façon stable par l'ADNc de la GGT humaine).
- Une fois notre outil d'étude à disposition, nous serons en mesure d'établir l'influence de la GGT sur la régulation du taux de GSH intracellulaire, souvent incriminé dans les mécanismes de résistance. Cette étude sera menée dans différents milieux de culture

incluant un milieu de culture riche en acides aminés précurseurs du GSH, ainsi qu'un milieu appauvri en cystéine.

- Nous pourrions également mesurer la cytotoxicité des deux agents dérivés du platine sur les deux lignées cellulaires dans les différentes conditions de culture. Ainsi, nous serons en mesure de déterminer si une surexpression de la GGT peut influencer la réponse cellulaire à ces médicaments.
- Dans le cas où nous observerions une cytotoxicité des composés testés différente en fonction du degré d'expression de l'enzyme, nous tenterons d'expliquer les mécanismes dépendant de la GGT qui entraînent une modification de la réponse cellulaire.

Par ces études, nous espérons apporter une explication sur les éventuels mécanismes de résistance impliquant une surexpression de la GGT. En effet, ce facteur n'a jamais été étudié indépendamment (par l'utilisation d'une lignée isogénique) et pourrait intervenir dans les défenses cellulaires contre le CDDP et/ou ses dérivés.

MATERIEL ET METHODES

1. Biologie cellulaire

1.1. Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées lors de notre étude.

- ✓ HeLa Tet-off : cellules humaines de cancer de l'endomètre (Clontech). Cette lignée est transfectée de façon stable par le plasmide pTet-off qui lui confère la résistance au G418 (néomycine). Ce plasmide code aussi pour un supresseur couplé à une protéine d'activation de la transcription inhibée par la doxycycline ou la tétracycline. Ainsi, dans ces cellules, l'expression des gènes sous le contrôle d'un promoteur TRE (élément de réponse à la tetracycline) sera inhibée par la présence de l'un des 2 antibiotiques. De cette façon, l'expression de gènes transfectés dans cette lignée est modulable.
- ✓ U937 : cellules sous-clonées de la lignée promonocytaire néoplasique originaire du liquide pleural d'un patient souffrant d'un lymphome histiocytaire diffus (Sundström and Nilsson, 1976). N° ATTC, CRL 1593
- ✓ HepG2 : Hepatome humain, N° ATTC : HB 8065.
- ✓ LNCap : Cellules de carcinome prostatique, N° ATTC : CRL 1740.

1.2. Milieux de culture

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Sigma) supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco BRL), 2 mM de glutamine et 1% (v/v) d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline/streptomycine/ fungizone) (Sigma).

Les cellules sont incubées dans une étuve à 37 °C sous atmosphère humide enrichie par 5 % de CO₂.

Les produits marqués sont décrits en annexes techniques.*

Au cours des études, un milieu DMEM sans méthionine ni cystéine a également été utilisé (Sigma). Ce milieu est alors supplémenté, avant utilisation avec ces 2 acides aminés, méthionine 50 μM et cystine 50 μM (Gibco).

1.3. Congélations et décongélations

Les stocks de cellules congelées sont préparés dans du SVF contenant 10 % de DMSO. Les cellules sont congelées lentement jusqu'à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis conservées dans l'azote liquide.

La décongélation des cellules se fait en les réchauffant rapidement à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans leur milieu de culture usuel. Les cellules sont utilisées pendant un nombre de passage limité (environ 20) avant la décongélation d'un nouveau stock.

1.4. Transfection transitoire des cellules

La transfection est un outil d'étude du contrôle de l'expression et de la régulation des gènes (recherche et étude d'éléments régulateurs de la transcription par exemple). Dans nos études, le gène reporteur utilisé est le gène de la luciférase. Quand les cellules sont transfectées de façon transitoire, l'ADN s'introduit dans le noyau de la cellule mais n'est pas intégré au génome.

Le réactif de transfection retenue pour nos expériences est le « Superfect » (Gibco-BRL). Ce composé est un dendrimère activé ; il a une structure sphérique et des « branches » terminées par des groupements aminés chargés. Il s'associe avec l'ADN pour donner des structures complexes qui vont posséder une charge nette globale positive, ce qui leur permet d'interagir avec des récepteurs cellulaires de charge négative à la surface des cellules et de pénétrer à l'intérieur de celles-ci.

Les cellules sont transfectées selon le protocole proposé par le fournisseur du Superfect. Les réactions sont effectuées en plaques de 12 puits, (les volumes indiqués correspondent à la réaction pour un puits) :

$1,5 \cdot 10^5$ cellules sont incubées dans le milieu adéquat à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO_2 durant 12 à 16 heures afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance (environ 50 à 70 %) de confluence. Lors de la transfection, 1,5 μg d'ADN sont mélangés avec 75 μl de milieu de culture ne contenant ni SVF, ni antibiotique (ces composés pouvant interagir avec

la formation des complexes ADN-Superfect). 7,5 µl de réactif Superfect sont ajoutés à la solution d'ADN. La formation des complexes s'effectue pendant 15 minutes à température ambiante, puis 400 µl de milieu complet est ajouté. Les cellules sont lavées une fois avec du PBS* stérile et incubées avec le mélange de transfection pendant 4 à 6 heures et 1 ml de milieu complet est ajouté.

24 heures après la transfection, les plaques sont lavées à 2 reprises au PBS et les cellules sont récupérées dans 200 µl de reporter Lysis buffer 1 X (Promega) pour le dosage de l'activité luciférase (paragraphe 3.8).

1.5. Etablissement d'une lignée stable

1.5.1. Transfection stable

Lors d'une transfection stable, l'ADN est intégré dans l'ADN chromosomique cellulaire. Les cellules ayant bien intégré l'ADN peuvent être distinguées en utilisant un marqueur de sélection (dans notre cas, la résistance à l'hygromycine).

Les cellules parentales HeLa possèdent une activité GGT relativement faible (10 à 15 mU/mg de protéines). Nous avons créé au laboratoire notre modèle d'étude en transfectant cette lignée de façon stable par l'ADNc de la GGT humaine (cf. liste des plasmides) cloné dans le vecteur pTRE2 (Clontech) (plasmide pTRE-GGT).

Les cellules HeLa Tet-off (Clontech) sontensemencées dans des boîtes de Pétri à $1,5 \cdot 10^6$ cellules par boîte. Après 24 heures, elles ont été cotransfectées par le plasmide pTRE-GGT et pTK-hyg, conférant une résistance à l'hygromycine (Clontech) dans un rapport 1/10. (liste des plasmides utilisés p.75)

1.5.2. Sélection

48 heures après la transfection, 100 µg/ml d'hygromycine (Gibco-BRL) sont ajoutés au milieu de culture des cellules HeLa afin de sélectionner les cellules ayant intégré le plasmide pTK-hyg.

Après environ 15 jours de sélection, les premiers clones commencent à apparaître. Lorsque le nombre de cellules le permet, les clones sont récupérés à l'aide de trypsine (Sigma)

individuellement en utilisant un cylindre stérile (Sigma) et repiqués dans le puits d'une plaque de 24 puits.

Chaque clone est individuellement amplifié. Lorsqu'il y a assez de cellules, les clones sont cultivés dans des flacons de culture de 75 cm² et des stocks sont préparés pour congélation dans l'azote liquide.

L'activité GGT de chaque clone est mesurée à chaque passage jusqu'à stabilisation de sa valeur.

Plusieurs clones présentant des activités de 20 à 1000 mU/mg de protéines ont été obtenus par cette technique. Après décongélation, les cellules HeLa-GGT sont entretenues et cultivées dans du milieu DMEM contenant 100 µg/ml d'hygromycine.

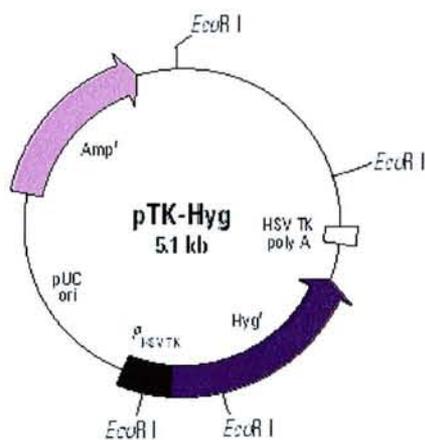
1.6. Mesure de la cytotoxicité par le test MTT

Ce test est utilisé pour évaluer une mort cellulaire et l'associer à la cytotoxicité d'un composé. Le MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium] (Sigma) est réduit par les déshydrogénases des cellules vivantes en cristaux insolubles de formazan de couleur bleu violet. Le test est réalisé sur plaque de 96 puits. Les cellules sontensemencées à raison de 4000 cellules par puits (volume par puits : 200 µl) et après une première incubation de 24 heures à 37°C, les cellules sont traitées pendant 24 ou 48 heures (selon le composé utilisé). L'utilisation d'une plaque de 96 puits permet d'effectuer 8 essais par traitement. A la fin des traitements, 20 µl d'une solution de MTT à 5 mg/ml dans du PBS sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 3 à 4 heures à 37 °C, le milieu de culture est éliminé et remplacé par 200 µl de DMSO afin de solubiliser les cristaux de formazan formés. La coloration violette obtenue est ensuite mesurée au moyen d'un lecteur de microplaques (DYNATECH MR 500[®]) à la longueur d'onde de 550 nm. Les valeurs sont rapportées au témoin non traité et exprimées en pourcentage de viabilité.

2. Biologie moléculaire :

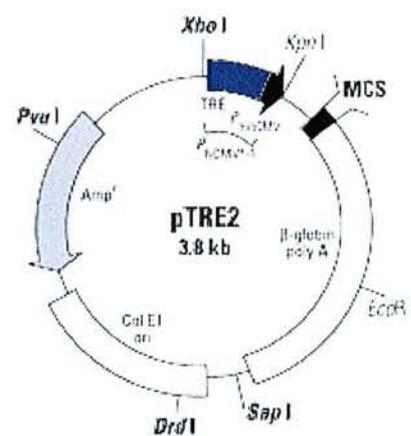
2.1. Vecteurs utilisés

PTK-Hyg (Clontech) :



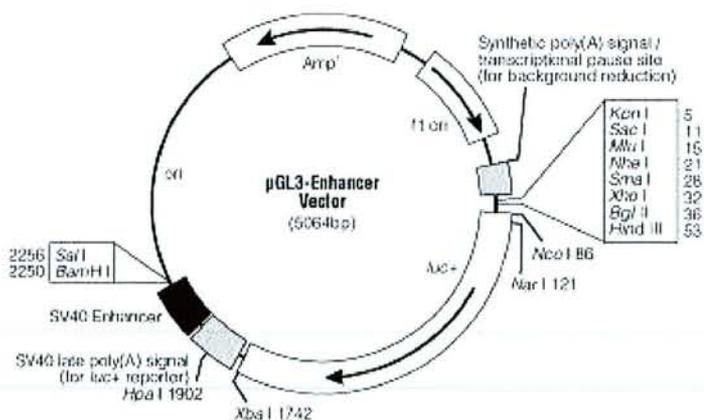
Ce vecteur est utilisé lors de la transfection stable des cellules HeLa, il confère une résistance à l'hygromicine qui est utilisée comme facteur de sélection.

PTRE2 (Clontech) :



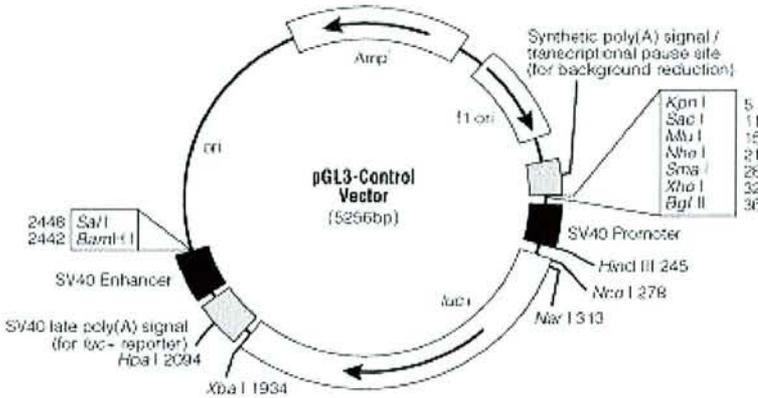
Le vecteur pTRE2 est utilisé pour la construction du plasmide pTRE-GGT contenant l'ADNc de la GGT humaine sous le contrôle du promoteur TRE.

pGL3-Enhancer (Promega):



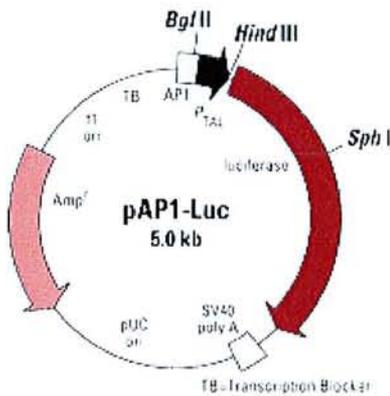
Ce vecteur est utilisé comme contrôle négatif lors des transfections transitoires car il ne contient pas de promoteur en amont du gène de la luciférase.

PGL3-Contrôle (Promega):



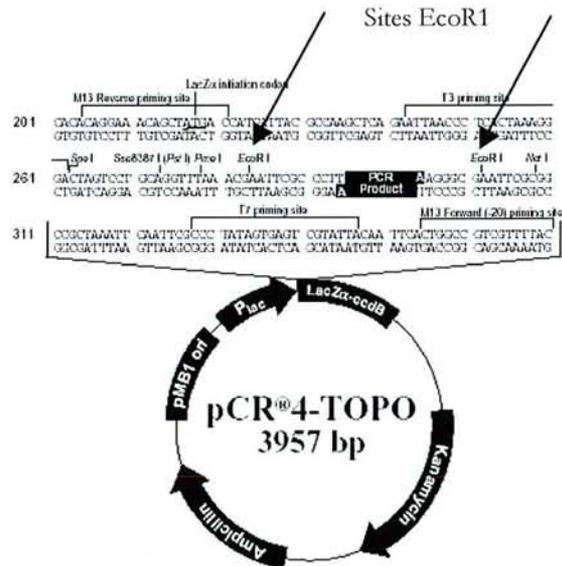
Ce vecteur est utilisé comme contrôle positif lors des expériences de transfections transitoires car il contient le promoteur SV40 en amont du gène de la luciférase.

pAP1-Luc (Clontech):



Ce vecteur contient 4 sites consensus pour AP1 en tandem en amont de la luciférase et il est utilisé comme contrôle positif de l'induction de AP1.

pCR4-Topo (Clontech) :



Les fragments d'ADN clonés dans ce vecteur peuvent être séquencés en utilisant les amorces M13 reverse et M13 forward. Ce vecteur a été utilisé pour le clonage et le séquençage des produits de 5' RACE.

2.2. Construction de vecteurs recombinants

2.2.1. Restriction d'ADN

L'ADN amplifié à insérer dans le plasmide et le vecteur de clonage sont digérés par des enzymes de restriction (Promega) compatibles, durant une nuit à 37°C dans les tampons adéquats. Les produits obtenus sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose et la bande du fragment recherché est alors découpée pour être purifiée.

2.2.2. Purification des fragments d'ADN

L'extraction de l'ADN de l'agarose est réalisée par le kit « GenElute™ Minus EtBr spin columns » (Sigma).

2.2.3. Ligation

La quantité de chaque fragment d'ADN à liguer est estimée après électrophorèse sur gel d'agarose* sous lumière UV (le mélange de ligation doit contenir environ 3 fois plus de fragment à liguer que de vecteur). Le mélange d'ADN est alors incubé avec 2 µl de tampon pour ligase 10X et 1 U de ligase (Promega) dans un volume final de 20 µl ajusté avec de l'eau stérile, pendant une nuit à 14°C.

2.2.4. Transformation

5 à 10 µl de produits de ligation sont incubés 30 min dans de la glace fondante en présence de 50 à 200 µl de bactéries compétentes DH5α* (Gibco-BRL). Le mélange subit ensuite un choc thermique d'une minute à 42°C (dans un bain-marie préchauffé), ce qui permet à l'ADN de passer à travers les pores de la membrane bactérienne. Après incubation de 2 min dans la glace, 600 µl de milieu LB* (Luria Bernati) sont ajoutés au mélange qui est ensuite incubé 1 heure à 37°C sous agitation. Les bactéries transformées sont alors étalées sur milieu nutritif LB gélosé contenant de l'ampicilline (facteur de sélection des bactéries ayant intégré un plasmide) et incubées toute la nuit dans une étuve à 37°C.

Tableau II : Amorces utilisées pour la construction des vecteurs pGGT C₄₈₉ et pGGT C₈₅₆

Amorce	Séquence	Position sur le gène I de la GGT (1= début de l'exon VII)
Prom 2- Hind	5'- CCCA <u>AAGCTT</u> CTGGGTCACACAGCACTGG-3'	+52 à + 71
Prom 489-Xho	5'- CCCCTCGAGACTTCCCTTCGAGTCCAGGT-3'	- 489 à - 470
Prom 856-Xho	5'- CCCCTCGAGGTCAGGGCTCCTTGAGAGA-3'	- 856 à -835

Les sites de restriction pour les enzymes *Hind* III et *Xho* I sont soulignés.

Ces amorces sont utilisées pour amplifier différents fragments du gène I de la GGT humaine et l'ajout de séquences pour les enzymes de restriction permet de cloner les produits de PCR aux sites *Hind* III et *Xho* I en amont du gène de la luciférase dans le plasmide pGL3 enhancer.

2.3. Minipréparation d'ADN plasmidique

C'est une technique classique de biologie moléculaire, qui a pour but d'extraire de l'ADN plasmidique à partir de cultures de faible volume (1,5 ml) afin d'isoler les clones intéressants.

Elle est dérivée de celle décrite par Sambrook *et al* (1989) : 1,5 ml d'une préculture, issue de l'inoculation d'une colonie dans du milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml), sont centrifugés quelques minutes à 8000 g à 4°C. Le culot bactérien est suspendu dans 200 µl de solution P₁ (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml de RNase A). Les cellules sont lysées par ajout de 200 µl d'une solution P₂ (2 N NaOH, 0,1% (p/v) SDS). Enfin, l'ajout de 200 µl de solution P₃ (2,55 M acétate de potassium pH 4,5) permet la précipitation des débris bactériens. Après centrifugation 10 min à 14000 g, le surnageant est récupéré, et l'ADN plasmidique est précipité à l'éthanol absolu et soumis aux analyses par des enzymes de restriction.

2.4. Maxipréparation d'ADN plasmidique

Cette technique a pour but de purifier des quantités plus importantes d'ADN plasmidiques (100 à 200 µg) à partir de cultures de 25 à 50 ml. Elle utilise le kit de purification «QIA filter midi» (Qiagen). Cette étape est indispensable à la préparation des vecteurs utilisés pour des transfections ou des séquençages.

25 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) sontensemencées avec 25 µl de préculture bactérienne et incubés durant une nuit à 37°C sous agitation. Les cellules sont centrifugées 10 min à 5000 g à 4 °C, et le culot bactérien est repris dans 5 ml de solution P₁. Les cellules sont lysées par addition de 5 ml de solution P₂. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 5 ml de solution P₃ sont ajoutés, et le mélange est placé durant 10 minutes dans la glace fondante, pour permettre la précipitation des débris bactériens. La colonne Qiagen est équilibrée avec 5 ml de solution QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% éthanol, pH 7,0, 0,15% Triton X-100). Après centrifugation 15 minutes 14000 g, 4°C, le surnageant de lyse cellulaire est déposé sur la colonne et qui est lavée deux fois avec 10 ml de solution QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% éthanol, pH 8,5). L'ADN est alors élué avec 5 ml de solution QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris HCl, 15% éthanol, pH 8,5) et précipité par ajout de 0,6 volume d'isopropanol et centrifugation à 14000 g durant 30 minutes à 4°C. L'ADN extrait est alors séché à l'air libre et resuspendu dans une solution TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

Dosage de l'ADN :

Le dosage de l'ADN se fait par mesure de l'absorbance à 260 nm. La concentration en ADN est calculée comme suit :

$$[\text{ADN}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times 50 \times \text{dilution}}{1000}$$

Une absorbance de 1 correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN.

La pureté de la préparation est évaluée par le rapport des absorbances mesurées à 260 et 280 nm qui doit se situer entre 1,8 et 2,1.

2.5. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux à partir de cellules en culture ou de tissus est réalisée par le kit GenElute™ Mammalian Total RNA (Sigma).

Les cellules sontensemencées en boîte de Pétri à 1.10^6 cellules par boîte 24 heures avant les traitements. Les ARN totaux sont extraits des cellules en culture 24 heures après le début des traitements. Les cellules ou les tissus sont lysés et homogénéisés dans une solution contenant du thiocyanate de guanidine et du 2-mercaptoéthanol afin de relarguer l'ARN et d'inactiver les RNases. L'homogénat est passé dans la colonne «GenElute filtration» et centrifugé pendant 2 min à 14000 g à 4°C. Cette étape permet d'éliminer les débris cellulaires et l'ADN. Un volume d'éthanol 70 % équivalent au volume de l'homogénat filtré est ajouté, et le mélange est introduit dans la colonne «GenElute binding». Après une centrifugation de 15 secondes à 14000 g, les ARN sont liés à la colonne. La colonne est ensuite lavée par les solutions de lavage 1 et 2 (fournies dans le kit). L'élution se fait en ajoutant 50 µl de solution d'élution sur la colonne «GenElute binding» et en centrifugeant pendant 2 min à 14000 g.

Dosage des ARN totaux :

Les ARN totaux sont dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm. La concentration en ARN est calculée comme suit :

$$[\text{ARN total}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times 40 \times \text{dilution}}{1000}$$

Une absorbance de 1 correspond à une concentration de 40 µg/ml d'ARN.

La pureté de la préparation est évaluée comme précédemment par le rapport des absorbances mesurées à 260 et 280 nm qui doit se situer entre 1,8 et 2,1.

2.6. Techniques d'amplification

2.6.1. Transcription inverse à partir d'ARN total

Cette réaction permet d'obtenir de l'ADN simple brin complémentaire (ADNc) aux espèces d'ARNm polyadénylés présentes dans la préparation des ARN totaux.

Ceux-ci sont spécifiquement hybridés avec un oligo(dT)₁₆₋₁₈ (Promega) qui sert d'amorce à la transcriptase inverse. Elle synthétise alors l'ADNc avec pour matrice la séquence de l'ARNm de 3' en 5'.

4 µg d'ARN total dans un volume de 11 µl d'eau stérile sont utilisés pour la réaction. Après une dénaturation à 70°C pendant 5 minutes, l'ARN est refroidi dans la glace. On ajoute les réactifs suivants :

0,5 µg d'oligo(dT)₁₆₋₁₈

1 mM de chaque dNTP (Sigma)

200 U de M-MLV reverse transcriptase (Promega)

dans un volume final de 50 µl contenant : 50 mM TrisHCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothréitol (DTT).

La réaction s'effectue pendant 2 heures à 37 °C. Les produits de transcription inverse sont conservés à - 80°C et peuvent être utilisés pour la réaction de PCR.

2.6.2. Réaction en chaîne de l'ADN polymérase (PCR)

Cette réaction permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie : il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. L'amplification se fait de façon spécifique grâce à l'utilisation d'amorces qui vont reconnaître la séquence à amplifier.

Les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés par Eurogentec en accord avec les séquences présentés dans le Tableau III

Tableau III : liste des amorces utilisées pour les PCR.

Oligonucléotide	Séquence	ARNm	taille du fragment	Hybridation (°C)	Nb de cycles
Amp1 Amp2	5'-AATGGACGACTTCAGCTCTCC-3' 5'-AGCCGAACCAGAGGTTGTAGA-3'	GGT type I	217 pb	54 °C	26
Type A S Type A AS	5'-CACAGGGGACATACAGTGAG-3' 5'GAAATAGCTGAAGCACGCGC-3'	GGT type I Sous type A	308 pb	54 °C	30
Type B S Type B AS	5'-GGATTCTCCCAGAGATTGCC-3' 5'-GAAGGTCAAGGGAGGTTACC-3'	GGT type I Sous type B	300 pb	54 °C	30 ou 35
Type C S Type C AS	5'-GCCCAGAAAGTGAGAGCAGTT-3' 5'-TCCAGAAAGCAGCTAGAGGG-3'	GGT type I Sous type C	386 pb	54 °C	30
β_2 -microglobuline S β_2 -microglobuline AS	5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3' 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	β_2 -microglobuline	120 pb	54 °C	30
prom 1 prom 2	5'-GGAGCTGGGCCAGCAATATGCAGCA 3' 5'-TCTGGGTCACACAGCACTGGGGCAC-3'	5' RACE		65 °C	20

S : amorce sens.

AS : amorce antisens.

La PCR débute par un cycle de dénaturation de l'ADN par la chaleur (2 min à 96 °C). Suivent plusieurs cycles de 3 étapes :

- ✓ La dénaturation (30 s à 96°C) qui va séparer les ADN double brin afin qu'ils servent de matrice aux cycles suivants.
- ✓ L'hybridation des amorces spécifiques en 5' et en 3' de la séquence à amplifier (30 s à 1 min à une température dépendant de la séquence à hybrider).
- ✓ L'élongation par la Taq polymérase: cette enzyme va synthétiser le brin d'ADN complémentaire en partant de l'amorce 3' vers l'extrémité 5', et de l'amorce 5' vers l'extrémité 3' (30 s à 1 min à 72°C).

Ainsi, la quantité d'ADN augmente de façon exponentielle à chaque nouveau cycle.

La PCR peut être réalisée à partir des produits de la transcription inverse ou à partir d'une matrice d'ADN clonée dans un plasmide.

0,2 à 2 ng de plasmide ou 0,5 à 2 µl de produit de transcription inverse sont utilisés pour la réaction de PCR.

On mélange par tube de PCR (volume final : 50 µl) : l'ADN à amplifier, le tampon fourni avec la polymérase 1X (Promega), 200 µM de chaque dNTP, 1µM d'amorce spécifique 3', 1 µM d'amorce spécifique 5', 2 à 5 U de Taq polymérase (Promega). Une goutte d'huile minérale est ajoutée éviter toute évaporation. Les tubes PCR sont alors soumis aux différents cycles de températures en utilisant le GenCycler™ (Biorad).

Analyse des produits de PCR :

A la fin de la PCR, les produits amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% p/v contenant du bromure d'éthidium fluorescent sous lumière UV. On peut ainsi quantifier les produits PCR en mesurant l'intensité de fluorescence. Les gels sont photographiés (caméra digitale DC120, Kodak) et analysés avec le logiciel 1D software (Kodak).

Remarques concernant les PCR semi-quantitatives :

Pour l'analyse semi-quantitative, les intensités des bandes correspondant à la séquence à quantifier sont rapportées à l'intensité de la bande obtenue après PCR sur la β_2 -microglobuline qui sert d'étalon interne. Pour ces PCR particulières, il est nécessaire d'établir avec précision les quantités de produit de transcription inverse à amplifier ainsi que le nombre de cycles car la réaction de PCR atteint un plateau à partir duquel les modulations ne sont plus quantifiables. Dans de bonnes conditions de PCR, l'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité d'ADN cible présent dans le mélange de produits de transcription inverse.

2.7. Amplification rapide des extrémités d'ADNc (Race PCR)

Les réactions de RACE permettent l'amplification de séquences nucléotidiques inconnues au niveau des extrémités 5' ou 3' d'un ARNm dont seule une séquence centrale est connue. La PCR se fait entre la partie connue et l'une des extrémités, ce qui permet de synthétiser l'ADNc correspondant à la totalité de l'ARNm étudié, et de le cloner. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'extrémité 5' de l'ARN de sous type C de la GGT humaine. Le kit de 5'RACE utilisé est le smart RACE cDNA amplification kit (Clontech). Le principe de la technique est résumé dans la Figure 18.

La première étape consiste à synthétiser un brin d'ADNc à partir de l'ARN poly A⁺. La RT du kit ajoute un marqueur «smart II A oligo» lorsqu'elle arrive à l'extrémité d'un ARNm. Ce marqueur est spécifiquement reconnu par l'amorce «Long up» lors du 1^{er} cycle de PCR. Ensuite l'amplification se fait en utilisant une amorce dans la partie connue de l'ADNc en 3' et une amorce qui va reconnaître l'extrémité en 5'. Les produits de PCR ainsi obtenus sont clonés dans un vecteur permettant le séquençage (Topo cloning kit, Invitrogen) et les colonies obtenues après transformation par ces vecteurs sont utilisées pour l'extraction de l'ADN plasmidique (mini préparation) suivi d'un screening par southern blot. Les plasmides positifs sont alors séquencés pour déterminer l'extrémité 5' de l'ADNc étudié.

Les PCR sont réalisées selon les recommandations du fournisseur du kit :

Synthèse du premier brin complémentaire (1^{re} réaction) :

L'ARN total extrait de placenta (1 µg) est incubé avec 1 µl du «5'-CDS» primer et 1 µl du «SMART II A oligo» dans un volume final de 5 µl. Le mélange est alors incubé 2 min à 70 °C puis refroidi dans la glace. Sont ensuite ajoutés 2 µl du « 5 X first strand buffer », 1 µl de DTT (20 mM), 1 µl du mélange des différents dNTP (1mM), 1 µl de la Power Script Reverse Transcriptase. L'ensemble est incubé 90 min à 42 °C. Les produits de transcription inverse sont utilisés dilués au 1/10 pour les PCR.

1^{ère} PCR :

2,5 µl de la première réaction sont incubés avec 5µl de « UMP » (10 X), 1 µM de l'amorce prom 1, 5 µl du « 10 X Advantage 2 PCR » , 1 µl du mélange de dNTP (10 mM), et 1 µl de « 50 X Advantage 2 polymerase mix. Le mélange est alors soumis à 25 cycles «94 °C, 5 sec ; 65 °C, 10 sec ; 72 °C 3 min»

2^{ème} PCR :

1 µl de la 1^{ère} PCR est utilisé pour la 2^{ème} PCR qui est réalisée de la même façon avec l'amorce prom 2 à la place de l'amorce prom1.

Les séquences des amorces prom1 et prom2 sont présentées dans le Tableau III.

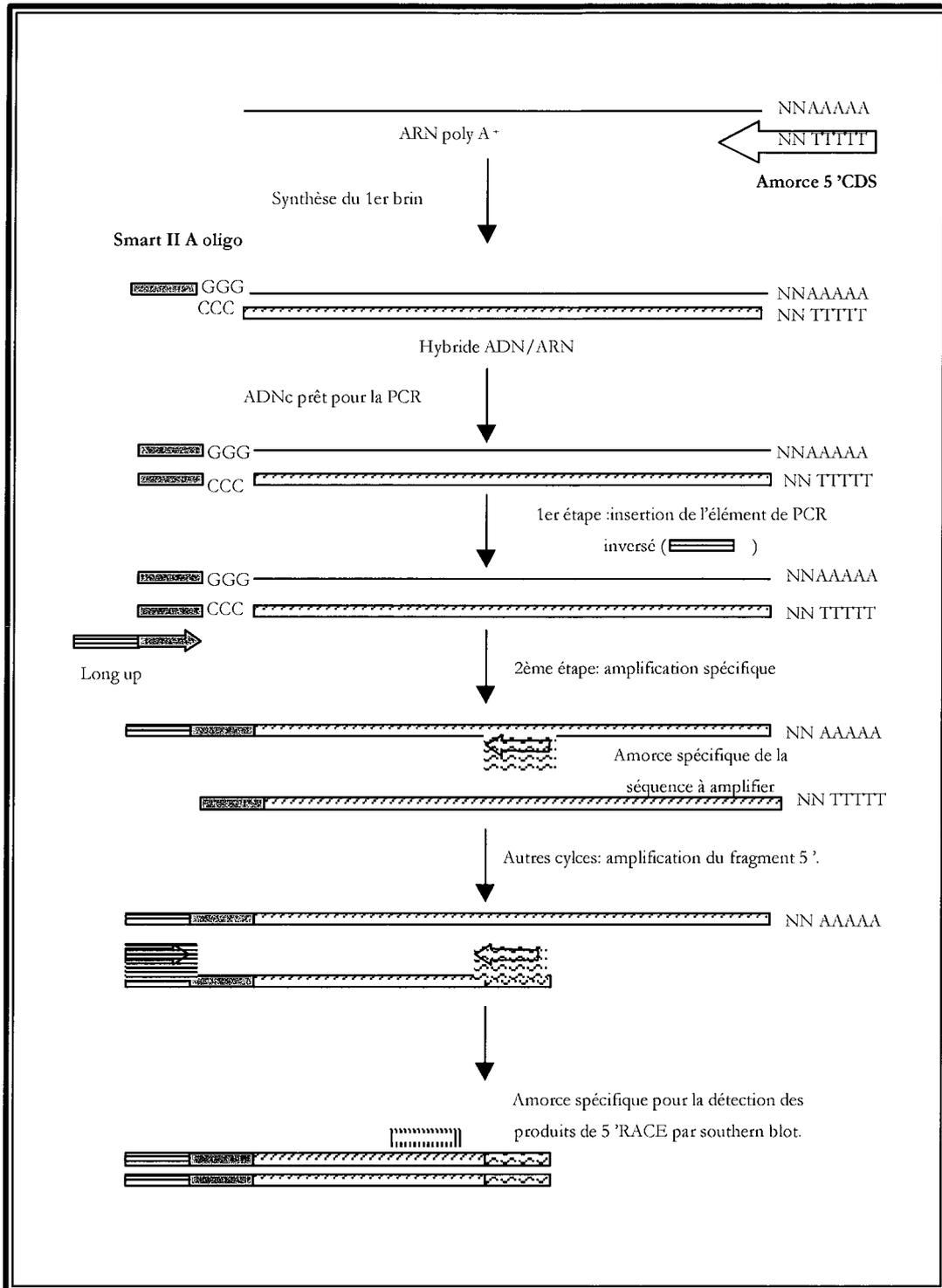


Figure 18 : Principe de la 5' RACE

2.8. Southern blot

Cette technique permet d'identifier avec précision une molécule cible d'ADN en l'hybridant avec une sonde spécifique marquée. Elle permet également de détecter des produits de PCR qui sont en trop faible quantité pour être détectés par électrophorèse sur gel d'agarose.

2.8.1. Transfert des produits de PCR sur membrane

On prépare un gel d'agarose sur lequel on fait migrer les échantillons. Le gel est ensuite découpé et lavé :

- 3 fois 15 min dans une solution de dénaturation (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl).
- 3 fois 15 min dans une solution de neutralisation (1M Tris/HCl pH 8, 1,5 M NaCl).

Le gel est alors disposé sur un papier Whatman qui trempe dans une cuve contenant du SSC* 10X. On place au-dessus une membrane de nylon (Hybond-N membrane, Amersham) puis 4 épaisseurs de papier Whatman imbibé de SSC 2X, une grande quantité de papier absorbant, le tout étant surmonté d'un poids de 500 g. Le transfert s'effectue toute la nuit grâce au flux de tampon SSC 10 X, l'ADN se trouve alors adsorbé sur la membrane. La membrane est récupérée, lavée dans du tampon SSC 2X et séchée à l'air libre. L'ADN est fixé à la membrane de nylon par une exposition de 3 min aux UV.

2.8.2. Hybridation de la membrane avec une sonde ADNc

La membrane est tout d'abord préhybridée pendant au moins 2 heures à 56°C dans une solution contenant du Denhart's 5X *, du 6X SSC, et du 0,5 % SDS (p/v), ce qui permet de saturer la membrane et donc de limiter les hybridations aspécifiques de la sonde.

La sonde est alors ajoutée à la solution de saturation pour l'hybridation. Nous utilisons des sondes complémentaires d'une séquence spécifique et marquée à la biotine (Eurogentec).

La liste des sondes utilisées lors de l'étude est présentée dans le tableau IV.

Tableau IV : Liste des sondes utilisées pour les southern blot

Sondes	séquence	ADNc reconnu
Type A blot	5'-GGGCAGGGCTTGGTGAATGGTAGCTGTGATTATCATCATG-3'	Sous type A
Type B blot	5'-CGCAGGATGGTGTGCGAGGACCCGAGCTGGTGTTCAGGC-3'	Sous type B
Type C Blot	5'-ATAGAGACACCGATTTCCTGGAGGTCCAAAGAGCCTCAGGA-3'	Sous type C
Prom 3	5'-GCCAACTGCTCTCACTTCTGGGCTCACCCGACG-3'	5'NT sous type C

L'hybridation s'effectue pendant une nuit à 56 °C

Après l'hybridation, la membrane est soumise à des lavages pour éliminer la sonde fixée sur des sites aspécifiques. Lors de ces lavages, la concentration en sels est progressivement diminuée ce qui revient à augmenter la stringence :

- 1^{ère} solution de lavage : 2X SSC, 0,1 % SDS (p/v) 2 fois 15 min à température ambiante
- 2^{ème} solution de lavage : 0,1X SSC, 0,1 % SDS (p/v) 2 fois 15 min à 56 °C.

Après ces lavages, la membrane est prête pour la révélation.

2.8.3. Révélation du southern blot

La révélation se fait en utilisant le kit «Phototope-Star detection» (Biolabs). Elle est basée sur la forte affinité de la biotine pour la streptavidine. La streptavidine va se lier à la sonde biotinylée accrochée à la membrane sur les sites spécifiques. La phosphatase alcaline (PAL) biotinylée reconnaîtra alors la streptavidine. Une fois cette enzyme fixée sur les bandes d'ADNc spécifique, il suffit d'incuber la membrane avec le substrat de la PAL (phénylphosphate substitué en 1,2 par le dioxétane). La PAL enlève un phosphate à ce composé, ce qui aboutit à la formation d'un composé intermédiaire modérément stable qui émet spontanément de la lumière à 461 nm. La lumière émise est détectée en exposant la membrane à un film sensible aux rayons X pendant 1 à 10 min.

La membrane est incubée dans une solution de blocage (5 % SDS (p/v), 17 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 125 mM NaCl) pendant 5 min.

Puis 1 µg/ml de streptavidine est ajouté à la solution de blocage. La membrane est incubée avec la solution contenant la streptavidine (50 µl/cm²) pendant 5 min et elle est lavée à 2 reprises pendant 5 min avec la solution de blocage diluée au 1/10 pour éliminer la streptavidine en excès.

L'incubation avec la PAL s'effectue pendant 5 min dans la solution de blocage contenant 0,5 µg/ml de PAL (50 µl / cm²). Les derniers lavages (10 mM Tris HCl pH 9,5, 10 mM NaCl 10 mM MgCl₂) (2 fois 5 min) permettent d'éliminer la PAL en excès et de ramener le pH à 9,5, valeur qui correspond au pH optimal de l'activité de la PAL. Le substrat «CDP-Star reagent» est fourni dans le kit avec son tampon 1 X, il est dilué, au 1/200^{ème} et mis au contact de la membrane pendant 5 min avant la révélation par un film XAR-5 (Kodak).

2.9. Préparation d'extraits nucléaires

L'extraction se fait selon la méthode décrite par Haglund *et al.* (1987), qui consiste à lyser les membranes plasmiques et nucléaires en milieu hypertonique et à séparer les différents constituants par centrifugation.

Pour éviter la dégradation des protéines, toutes les étapes de l'extraction doivent être réalisées à 4°C ou sur glace et un mélange d'inhibiteurs de protéases est ajouté aux réactifs (Complete™, Boehringer Mannheim). Une boîte de Pétri estensemencée avec la lignée cellulaire à étudier la veille du traitement de façon à arriver à 80% de confluence le jour de la stimulation. 16 heures avant le traitement, le milieu complet est remplacé par du milieu sans sérum de veau fœtal.

Les cellules sont traitées pendant 2 heures avant l'extraction des facteurs nucléaires, puis lavées au PBS 1X, avant d'être grattées et resuspendues dans 2 ml de PBS 1X. Après centrifugation 2 min à 4000 g, les cellules sont resuspendues dans 500 µl de tampon A (0,5 M HEPES pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 0,25 M EDTA, 40 µl/ml inhibiteurs de protéases). De nouveau centrifugées 2 min à 4000 g, elles sont ensuite resuspendues dans 300 µl de tampon B (0,5 M HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10 µl Nonidet p-40, 40 µl/ml Inhibiteur de protéases) (ce qui permet la dégradation de la membrane cytoplasmique) et incubées 30 min dans la glace. Après centrifugation 5 min à 6000 g, les protéines cytoplasmiques sont éliminées, et l'incubation des noyaux dans 150 µl de tampon d'extraction : 20 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, Glycérol 20% (v/v), 40 µl/ml inhibiteurs de protéases durant 30 min sur table agitante à 4°C provoque la dégradation de la membrane nucléaire. La centrifugation à 14000g durant 30 min à 4°C permet la séparation du surnageant qui contient les extraits nucléaires. Les extraits nucléaires sont conservés à -80°C.

2.10. Expériences de retardement sur gel

2.10.1. Sondes utilisées et marquages

Les oligonucléotides utilisés pour l'étude du promoteur B sont synthétisés par Eurogentec en accord avec les séquences présentées dans le tableau suivant :

Tableau V : sondes utilisées pour les expériences de retardement sur gel

Nom des oligonucléotides		Séquence
AP1 collagénase	S	CGCTTGATGACTCAGCCCGGAA
	AS	TTCCGGGCTGAGTCATCAAGCG
AP1-I GGT	S	TGGCGGCCTGAGTATGGCCC
	AS	TGGGGGCCATACTCAGGCCG
ARE GGT	S	CGCCAGCAAGTGACAGGCTGGGACCAA
	AS	TTGGTCCCAGCCTGTCACTTGCTGGCG
AP1-II GGT	S	TTGGGGCTCTGAGAGGACCAC
	AS	TTGGGGTCCCTCTCTCAGAGCC

S : sens

AS : antisens

1,5 µg des oligonucléotides sens et antisens sont hybridés dans du tampon (335 mM Tris pH 7,5, 65 mM MgCl₂, 33 mM DTT, 6,5 mM EDTA) selon les étapes suivantes :

10 min de dénaturation à 90 °C, 10 min à 65 °C, 10 min à 37 °C et 10 min à 20 °C.

Les sondes double-brins sont alors marquées au ³²P par transfert du γ^{32} P-ATP (ICN, [³²P]-ATP activité spécifique : 7000 Ci/mmol] sur l'extrémité 5' OH de l'oligonucléotide par la T4 Polynucléotide Kinase (Roche).

200 ng de l'oligonucléotide double-brins sont mélangés à 2 µl de tampon kinase 10X, 1 µl de T4 Polynucléotide Kinase, 2 µl de γ^{32} P-ATP dans un volume final de 20 µl. Ce mélange est incubé

30 min à 37 °C puis 10 min à 75 °C. L'ADN marqué est purifié sur colonne de silice par le kit « Qiaquick Removal Nucleotide Kit » (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant.

Préparation du gel de polyacrilamide 5% (25 ml):

Acrylamide/bisacrylamide (29 :1) 30 %:	8 ml
TBE 10 X :	2,5 ml
Persulfate d'ammonium 10% :	0,5 ml
TEMED	50 µl

2.10.2. Retard de migration sur gel

Les extraits nucléaires sont incubés en présence des sondes radiomarquées ; les complexes formés par la liaison des protéines à l'ADN sont séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide en fonction de leur masse moléculaire.

5 µg de protéines nucléaires sont incubées avec 2,5 µl de poly[d(I-C)] à 2 µg/µl (Amersham Pharmacia) et 1 µl de la sonde spécifique marquée dans le tampon d'incubation (50 mM Tris pH 8,5, 250 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 20% glycérol, 2,5 mM DTT) pour un volume final de 20 µl.

L'ajout de poly[d(I-C)] permet d'éviter la formation de complexes non spécifiques.

L'incubation se fait pendant 15 min à température ambiante. Puis, le mélange est déposé sur le gel de polyacrylamide pour la migration dans du TBE* 0,5 X pendant 2 h à 200 V. Le gel est alors fixé dans un mélange acide acétique 10 %, méthanol 20 % et séché à chaud par aspiration sous vide. La révélation se fait par autoradiographie.

Les expériences de compétitions spécifiques se font en ajoutant au mélange d'incubation de la sonde double brin non marquée en excès.

Les expériences de « Supershift » sont réalisées en préincubant les extraits nucléaires avec 2 µg de l'anticorps p-c-Jun (sc-822) (Santa Cruz Biotechnology) pendant 30 min dans la glace avant d'ajouter la sonde.

3. Mesures biologiques

3.1. Dosage des protéines

Le contenu en protéines dans les échantillons est déterminé par la méthode « BIORAD protein assay » (Biorad) en utilisant de BSA (albumine bovine sérique) (Sigma). Il s'agit d'une mesure colorimétrique à 595 nm basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie lorsqu'il se lie aux acides aminés aromatiques et basiques (notamment l'arginine).

3.2. Dosage de l'activité GGT

Le L- γ -glutamyl 3-carboxy 4-nitranilide 6 mM (substrat donneur) est métabolisé par la GGT qui effectue un transfert du résidu γ -glutamyle de ce substrat vers le dipeptide GlyGly (substrat accepteur) contenu dans le tampon de réaction (Tris HCl, pH 8,25) à la concentration de 150 mM. L'apparition du 5-amino 2-nitrobenzoate (produit de la réaction) est suivie en point final ou en cinétique par la lecture de l'absorbance à 405 nm. Les résultats de cette mesure sont rapportés à la quantité de protéines totales (mg) contenues dans chaque échantillon et l'activité spécifique est exprimée en mU/mg de protéines.

$$\text{Activité GGT mU/mg} = \frac{A_{405} \times \text{dilution} \times 1212}{\text{Temps d'incubation (min)} \times \text{concentration en protéines}}$$

3.3. Dosage du glutathion réduit intracellulaire

Les cellules sont cultivées et traitées en plaque de 6 puits dans le milieu de culture adéquat pendant 24 ou 48 heures. Les plaques sont alors lavées par du PBS stérile et froid. Le contenu d'un puits est récupéré dans 300 μ l de PBS et les protéines cellulaires sont précipitées par de

l'acide perchlorique 10 % (p/v) froid dilué au 1/3 extemporanément. L'échantillon est centrifugé à 4°C, 14 000 g pendant 10 min. Le culot protéique est conservé à - 20 °C ; il est utilisé pour le dosage des protéines, tandis que le surnageant contenant le GSH intracellulaire est conservé à - 80 °C jusqu'à l'analyse.

L'analyse du glutathion réduit s'opère par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un dispositif de réaction post-colonne et à une détection spectrofluorimétrique. Le processus chromatographique mis en œuvre est de type partage à polarité de phases inversée associé à un appariement d'ions entre le groupe amine ionisé du glutathion et un contre-ion anionique hydrophobe, le *n*-décylsulfate. L'élution se fait en régime isocratique (Leroy *et al*, 1993). Le système CLHP est composé d'une pré-colonne dimensions 4x4 mm d.i. (LiChrospher 100 RP 18 end capped, 5 µm ; Merck Darmstadt), et d'une colonne analytique 125x4 mm d.i. (Nucleosil 100 C18 ou Spherisorb ODS, 5 µm, Macherey Nagel).

La phase mobile est un mélange acétonitrile - tampon phosphate 10 mM pH = 2,5 additionné de *n*-décylsulfate de sodium 0,5 mM, dans les proportions 6:94 (v/v), elle contient également 0,1 mM d'EDTA. L'élution est réalisée à un débit de 1,2 ml/min et à une température de colonne de 40°C. L'équilibre du système chromatographique est obtenu en 2 heures et se traduit par un temps de rétention reproductible du glutathion (entre 4 et 6 min). La réaction chimique de dérivation est réalisée en mode post-colonne. Elle fait intervenir deux groupes chimiques du glutathion (amine primaire et sulfhydryle) pour la condensation avec le réactif *ortho*-phtaldéhyde (OPA, Fluka) à 0,8 mg/l dans un tampon borate 350 mM pH 10,5. Le composé qui en résulte est mesuré par un détecteur spectrofluorimétrique (modèle JASCO FP-920) ($\lambda_{ex} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 440$ nm).

Une gamme d'étalonnage de 0,05 à 1,0 µg/ml de GSH est injectée dans le système, et l'aire des pics obtenus est calculée. Les résultats sont exploités à l'aide d'un dispositif d'acquisition et de traitement des données (système Borwin).

3.4. Dosage du GSH et de la CysGly extracellulaire

Les cellules sont cultivées en boîtes de Pétri dans le milieu approprié pendant 24 heures. Les traitements sont effectués dans du PBS stérile car le milieu de culture ne peut pas être injecté

dans le système CLHP. 200 µl du milieu de culture sont prélevés de la boîte de Pétri à différents temps et sont mélangés à un volume égal d'une solution d'acide perchlorique à 10% (p/v), dilué extemporanément au tiers. S'il apparaît un précipité, l'échantillon est centrifugé à 14000 g à 4°C durant 5 min. Les cellules sont récupérées dans du PBS pour le dosage des protéines. Le dosage des différents thiols à l'état réduit dans le milieu de culture s'effectue ensuite par CLHP de partage à polarité de phases inversées couplée à une détection spectrofluorométrique, selon le protocole établi par Salazar *et al.* (1999). Cette technique permet d'identifier et de doser (par étalonnage interne) la cystéine, la cystéinyglycine, la γ -glutamylcystéine et le glutathion réduit dans les extraits de cultures cellulaires. La réaction de dérivation pré-colonne met en jeu le 7-fluoro-2,1,3-benzodiazole-4-sulfonamide (ABD-F) (Sigma), un réactif spécifique des groupes thiol permettant l'obtention de dérivés fluorescents.

Le système CLHP est le même que celui utilisé pour le dosage du GSH intracellulaire. Les cellules sont diluées au 1/10^{ème} dans 9 ‰ NaCl et 4 mM EDTA. A 100 µl de la suspension cellulaire sont ajoutés 50 µl de la solution d'étalon interne (acide thioglycolique (TGA) à 300 µM), 20 µl de 0,50 M NaOH, 250 µl de tampon borate 0,2 M pH 9,0, 50 µl de solution de tri-n-butylphosphine (TBP) 5 % (v/v), 50 µl de solution d'ABD-F à 2,3 mM. Le mélange est placé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Avant l'injection, les échantillons sont refroidis dans la glace et 50 µl d'HCl 1 M sont ajoutés de façon à amener le pH à 1. Une gamme d'étalonnage de 1 à 50 µM de CysGly, et de 50 à 200 µM de GSH est injectée dans le système et les aires des pics sont calculées. Les résultats sont exprimés en µmol de GSH ou de CysGly/mg de protéines en fonction du temps d'incubation.

3.5. Dosage de l'activité γ glutamylcystéine synthétase

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri pendant 24 heures et traitées par les dérivés du platine pendant 24 ou 48 heures. Elles sont collectées dans du PBS froid stérile (volume proche de 1,5 ml) et congelées à - 80°C. Après décongélation dans la glace fondante, on ajoute 10 µl d'une solution d'acivicine (inhibiteur de la GGT) à 0,5 mM (Sigma). Le mélange est centrifugé 14000 g pendant 10 min à +4°C, le surnageant est utilisé pour le dosage des protéines et la mesure de l'activité γ GCS.

Le milieu réactionnel (volume final 610 μ l) utilisé pour la mesure de l'activité de la γ GCS est le suivant :

- 60 μ l de tampon 1 M Tris-HCl pH 8,25
- 60 μ l de solution 200 mM MgCl₂ /500 mM KCl
- 200 μ l de solution 45 mM d'acide L-glutamique
- 60 μ l de solution 30 mM cystéine /60 mM DTT
- 60 μ l de solution 60 mM ATP
- 10 μ l de solution 0,5 mM acivicine
- 160 μ l d'échantillon.

La réaction est initiée par l'addition de l'échantillon et le mélange est incubé à 37°C pendant une durée de 5, 10 et 15 min, (durée modifiable en fonction de l'activité). La réaction est arrêtée par dilution (1/5^{ème} ou 1/10^{ème}) d'une partie du milieu réactionnel dans 100 mM HCl, 2 mM EDTA.

Le dosage de la γ -GluCys, produit de la réaction enzymatique catalysée par la γ -GCS est réalisé par CLHP dans un système analogue à celui utilisé pour le GSH (section 3.3). Les résultats sont exprimés en nmol γ -GluCys formées/mg de protéines/min.

3.6. Dosage de la production d'espèce réactives de l'oxygène

La production d'ERO a été mesurée en utilisant une sonde fluorescente : la dihydrorhodamine 123 (DHR-123)

La DHR-123 est une molécule non fluorescente qui s'oxyde en un dérivé fluorescent, la rhodamine 123 (Rh-123) après réaction avec les différentes ERO : \cdot OH, O₂ \cdot^- et H₂O₂ (Royall and Ischiropoulos, 1993) (Figure. 19). L'accumulation de la sonde oxydée est proportionnelle à la production d'ERO.

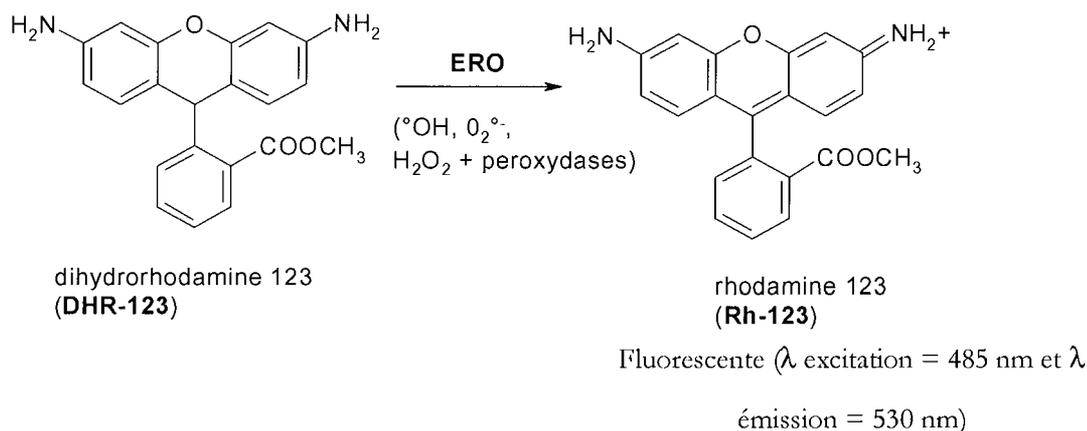


Figure 19 : Oxydation de la DHR-123 en Rh-123

La solution stock de DHR-123 est préparée dans du diméthylformamide (DMF) à une concentration de 10 mM. La solution stock de Rh-123 est préparée dans du méthanol à une concentration de 10 mM et est utilisée pour la réalisation de la courbe d'étalonnage.

Les cellules sontensemencées en plaques de 6 puits 24 heures avant l'expérimentation. Les incubations se font dans du PBS car le milieu de culture interfère avec la lecture en fluorescence. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS stérile et incubées 1 heure dans du PBS (2 ml par puits) à 37 °C contenant 1 mM de GSH, 25 μM de DHR-123, 150 μM Fe^{3+} et 165 μM EDTA. Des aliquots de 200 μl de milieu sont prélevés à différents temps et la fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (cytofluor 2350, Millipore) à des longueurs d'onde d'émission et d'excitation de 485 nm et 530 nm respectivement. L'évolution du mélange 1 mM de GSH, 25 μM de DHR-123, 150 μM Fe^{3+} et 165 μM EDTA (sans cellules) est également suivie et sert de contrôle (les valeurs de fluorescence obtenues sont soustraites à chaque temps). La concentration des ERO dans les milieux réactionnels est exprimée en μM de Rh-123 formée par l'oxydation de la DHR-123 et quantifiée par rapport à la gamme d'étalonnage.

3.7. Mesure de la formation des adduits Thiols- Cisplatine

3.7.1. Mesure de la cinétique de formation des adduits GSH- CDDP et CysGly-CDDP in vitro

L'analyse des adduits thiols-CDDP est réalisée par CLHP. Nous avons développé une technique à partir du protocole décrit par Bernareggi *et al* (1995). Le système utilisé est composé d'une pompe isocratique, d'un injecteur avec une boucle de 20 μ l (Rheodyne 7125), et d'une colonne LiChrospher RP 18 end capped (5 μ m) 250 X 4 mm (Merck Darmstad). La phase mobile est un tampon phosphate de triéthylamine 0,35 mM pH 2,5 ; elle est utilisée à un débit de 0,8 ml/min. Le CDDP, le GSH, la CysGly et les adduits GSH-CDDP et CysGly-CDDP sont détectés à 215 nm, leurs temps de rétention sont respectivement de 2,7 ; 5,5 ; 2,8 ;3 et 3,3 min.

Les solutions stocks de CDDP et de chaque thiol sont préparées à une concentration de 3,3 mM dans du tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant 150 mM NaCl. Dans un tube à 37°C, le CDDP et l'un des thiols sont mélangés dans un rapport 1/10 (GSH ou CysGly 9 mM, CDDP: 0,9 mM). Des aliquots du mélange (100 μ l) sont prélevés à différents intervalles de temps entre 0 et 25 min et injectés directement dans le système de CLHP.

L'absorbance spécifique des adduits étant inconnue, le taux de formation des adduits (mM/min) est calculé en considérant que l'absorbance de l'adduit est principalement due à celle du thiol qui le compose.

3.7.2. Détection des adduits CDDP-CysGly dans le milieu extracellulaire

Pour détecter spécifiquement l'adduit CysGly-CDDP dans un milieu extracellulaire complexe, il a fallu développer un autre système CLHP permettant une bonne séparation de cet adduit par rapport aux temps de rétention des autres composés présents dans le milieu : la GlyGly, le CDDP, le GSH, et les adduits GSH-CDDP. Le système est composé d'une colonne Aquasil C18

(3 μm) 150 X 3 mm ID (Thermo Hypersil). La phase mobile est un tampon phosphate 10 mM pH 2,7 contenant 5 mM d'acide pentanesulfonic (contre-ion) à un débit de 0,5 ml/min. Les composés sont détectés à 215 nm. L'addition du contre-ion permet une bonne séparation des adduits GSH-CDDP et CysGly-CDDP. Dans ces conditions, les temps de rétention sont : 2,0 ; 3,3 ; 5,8 ; 6,0 ; et 7,8 min pour le CDDP, l'adduit GSH-CDDP, le GSH, la CysGly et l'adduit CysGly-CDDP.

Les cellules sontensemencées dans des boites de Pétri 24 heures avant les dosages dans le milieu adéquat. Les incubations avec le CDDP et le GSH se font dans du PBS car le milieu de culture ne peut pas être injecté dans le système CLHP. Les cellules HeLa et HeLa-GGT sont mises en présence de GSH 1 mM, GlyGly 5 mM et CDDP 100 μM à 37 °C. Le milieu extracellulaire est prélevé à différents temps et utilisé pour mettre en évidence la formation d'adduits CysGly-CDDP dans le milieu extracellulaire.

3.7.3. Mesure de la cinétique de formation des adduits CysGly-CDDP en présence de GGT purifiée

Pour étudier l'influence de la GGT sur la formation des adduits CysGly-CDDP, nous avons incubé 1 mM de GSH et 0,5 mM de CDDP en présence d'une source de GGT purifiée à partir des cellules HeLa-GGT (130 mU) dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant 150 mM de NaCl. 100 μl du mélange sont prélevés aux temps 0 ; 7,5 ; 15 ; 20 ; 60 ; 90 et 120 min (les essais sont réalisés en triple). Les échantillons sont acidifiés par l'ajout de 1 μl d'acide phosphorique à 10 % et injectés dans le système CLHP utilisant la phase stationnaire Aquasil (Thermo Hypersil C18, 3 μm , 150X3 mm, la phase mobile tampon phosphate 0,1 M, pentane sulfonate de sodium 5 mM. Les composés sont détectés à 215 nm. Le calcul des concentrations est réalisé à partir d'une gamme d'étalonnage pour le GSH, le CDDP et la CysGly.

3.8. Dosage des activités luciférase

L'émission de photons résultant de l'activité luciférase est mesurée à l'aide d'un luminomètre Lumac-3M en intégrant le pic de lumière durant 10 s à 25°C. 10 μl de surnageant cellulaire sont

ajoutés au tampon suivant : 20 mM Tricine, 1,07 mM [(MgCO₃)₄Mg(OH)₂], 2,67 mM MgSO₄, 0,01 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 0,27 mM Coenzyme A, 0,47 mM luciférine, 0,53 mM ATP.

Les résultats sont exprimés en unité de lumière standardisée de la manière suivante :

$$\frac{\text{Activité luciférase (Unité de lumière arbitraire}/\mu\text{l de surnageant cellulaire)}}{\text{Concentration en protéines du surnageant cellulaire (mg)}}$$

Analyses statistiques des résultats expérimentaux :

Lorsque le nombre de données le permet, une analyse statistique des résultats est effectuée. La comparaison de la moyenne de chaque dosage avec la moyenne du contrôle se fait selon le test *t* de Student en situation bilatérale avec un risque de 1^{ère} espèce consenti de 10%.

Les symboles utilisés dans cette étude sont les suivants :

- * significatif à $p < 0,01$
- ** significatif à $p < 0,005$

Annexes techniques :

PBS tampon phosphate de Dubelcco : 1 X

KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
NaCl	8 g/l
NaH ₂ P ₄ O ₄	1,15 g/l

DH5 α : Souche d'*E.Coli* compétentes de genotype F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻,m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ .

LB : milieu de Luria Bertani

Bactotryptone	10 g
---------------	------

Extrait de levure 5 g
 NaCl 5 g
 Ajuster à pH 7, avec NaOH
 H₂O qsp 1 litre

Pour le milieu gélosé, ajouter 15 g d'agar par litre.

SSC 20X

NaCl 3M
 Citrate de sodium 0,3 M

Denhardt's 100X

Ficoll 400 2 % (p/v)
 Polyvinylpyrrolidone 2 % (p/v)
 BSA 2 % (p/v)

Gels d'agarose :

1 à 1,5 g d'agarose sont ajoutés pour 100 ml de tampon TAE 1X. La solution est portée à ébullition jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Le gel est pris en masse en refroidissant.

TAE 50 X (pour 1 litre)	Tris base	242 g
	Acide acétique glacial	57,1 ml
	EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
TBE 10X (pour 1 litre)	Tris base	108 g
	Acide Borique	55 g
	EDTA 0,5 M pH 8	40 ml

RESULTATS 1^{ère} PARTIE

1. Partie I : Régulation de l'expression de la GGT humaine

L'organisation des gènes et le profil d'expression des différents ARNm de la GGT humaine sont particulièrement complexes par rapport à ceux d'autres espèces (rat, souris), ce qui a empêché l'élucidation des mécanismes de sa régulation. Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des modulations de l'expression de la GGT par différents composés connus pour activer certaines voies de régulation, et notamment :

- Le TPA, inducteur de différenciation cellulaire et activateur des facteurs de transcription AP1 et NFκB.
- Le TNFα, cytokine multifonctionnelle activant, entre autres, le facteur NFκB.
- Le butyrate de sodium (NaBu), agent ayant des effets pléiotropiques qui module l'expression des gènes en inhibant l'histone désacétylase modifiant ainsi la conformation de l'ADN.

Pour répondre au 1^{er} objectif nous avons étudié dans différentes lignées cellulaires, l'effet de ces agents sur le niveau d'expression de l'ARNm I total de la GGT (ARNm I_T) et sur le niveau d'expression de chaque sous type d'ARNm I (A, B et C). Afin d'expliquer les variations observées, nous avons étendu notre étude aux régions promotrices contrôlant l'expression des ARNm I_B et ARNm I_C.

1.1. Etude de la modulation de l'expression de la GGT dans 4 lignées cellulaires

Pour déterminer quels stimuli entraînent une modulation de l'expression de la GGT, nous avons traité 4 lignées cellulaires humaines, chacune reflétant un type cellulaire différent : les cellules U937 (lignée hématopoïétique), les cellules HeLa (issues d'un carcinome de l'endomètre), les cellules HepG2 (lignée cellulaire issue d'hépatome), et les cellules LNCap (cellules issues de tumeur prostatique). Ces différentes lignées ont été traitées par du TNFα (200 U/ml), du TPA (2

μM) ou du NaBu (2,5 mM) pendant 24 heures pour l'étude de l'expression des différents types de messagers, et pendant 48 heures pour les mesures de l'activité GGT. La démarche expérimentale est résumée dans la Figure 20.

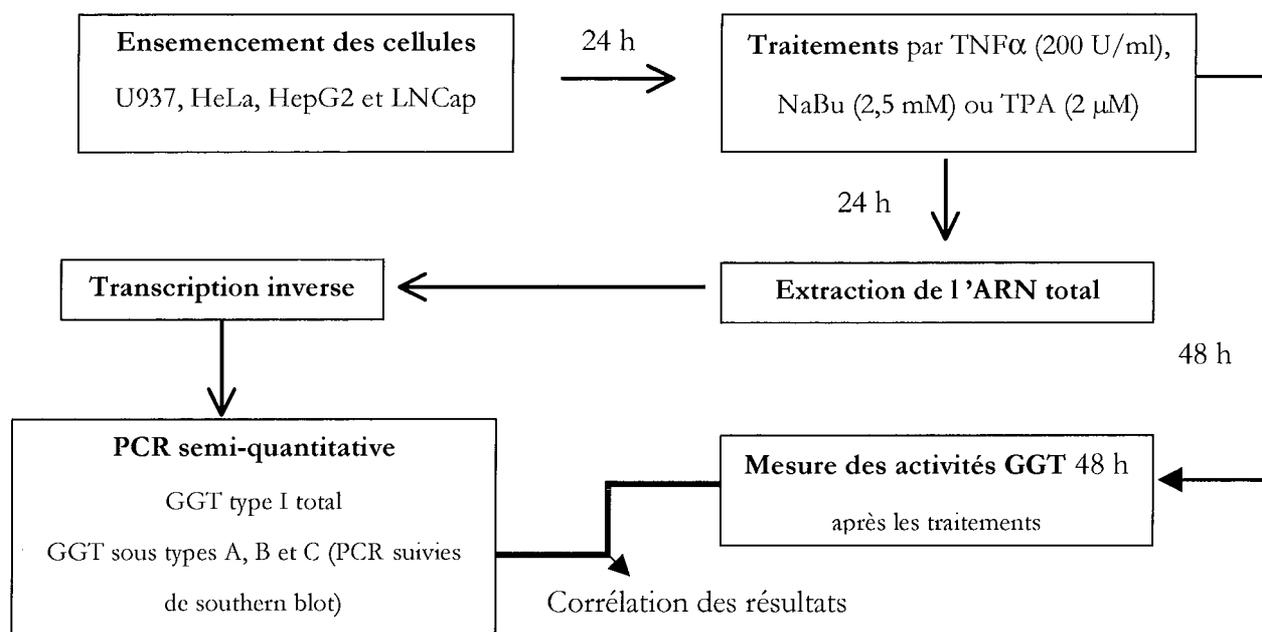


Figure 20 : Démarche expérimentale pour l'étude de la régulation de la GGT humaine.

1.1.1. Modulation de l'activité GGT :

Les résultats de mesures de l'activité GGT sont récapitulés dans le Tableau VI. La première observation à retirer de ce Tableau est que l'activité GGT varie en fonction du type cellulaire (Tableau VI, colonne contrôle). L'activité la plus faible ($16 \pm 0,8$ mU/mg de protéines) est retrouvée dans les cellules HeLa et l'activité la plus élevée ($144 \pm 11,3$ mU/mg de protéines), dans les cellules HepG2. Les cellules LNCap et U937 montrent des activités intermédiaires de $30 \pm 3,5$ et $61 \pm 6,1$ mU/mg de protéines respectivement.

La seconde observation est que pour chacun des 3 traitements, l'effet sur l'activité GGT est spécifique du type cellulaire. Le traitement par le $\text{TNF}\alpha$ ne modifie pas l'activité de cette enzyme dans les lignées HeLa et U937, mais il l'induit dans les cellules HepG2 et il l'inhibe dans les cellules LNCap. Le traitement par le TPA induit l'activité GGT dans les cellules HepG2 et U937

alors qu'il entraîne une diminution de cette activité dans les cellules LNCap. Le traitement par le NaBu n'a pas d'effet sur l'activité GGT dans les cellules HeLa et U937, en revanche, nous avons observé une diminution de la GGT dans les cellules HepG2 et LNCap.

Tableau VI : Effets du TNF α , TPA et NaBu sur l'activité GGT

Lignée cellulaire	Activité GGT (mU/mg protéines)			
	Contrôle	TNF α U/ml	TPA 2 μ M	NaBu 2,5 mM
HepG2	144 \pm 11,3	173 \pm 8,5 *	173 \pm 3,2 *	66 \pm 5,7 **
LNCap	30 \pm 3,5	9 \pm 0,5 **	19 \pm 0,7 *	23 \pm 2,8 *
HeLa	16 \pm 0,8	17,8 \pm 1,5	17 \pm 1,0	19 \pm 1,8
U937	61 \pm 6,1	63 \pm 11,3	102 \pm 10,5 **	66 \pm 3,1

Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart type de 3 expériences indépendantes ; * p<0,01 ; **p<0,005 par rapport aux cellules non traitées (contrôle).

Ces premiers résultats confirment déjà la complexité et la spécificité de la régulation du niveau d'expression de la GGT humaine.

1.1.2. Modulation du taux d'ARNm total de la GGT :

Afin de déterminer si les variations de l'activité GGT proviennent d'une modulation de la synthèse de l'enzyme, nous avons mesuré le taux d'ARNm I_T de la GGT, 24 heures après les différents traitements.

Pour ce faire, nous avons employé une technique de RT-PCR utilisant les amorces Amp1 et Amp2 (Courtay *et al*, 1994), qui amplifie un segment dans la partie codante des ARNm I de la GGT. Ainsi, le signal obtenu reflète la quantité de séquences potentiellement traductibles en une enzyme active. Le taux d'expression de l'ARNm de la β_2 -microglobuline a été utilisé comme standard interne : la quantification du signal obtenu pour cet ARNm montre que l'expression de ce gène ne varie pas significativement suite aux traitements utilisés dans toutes les lignées étudiées. Ainsi, après quantification de la bande correspondant à l'ARNm I_T, le résultat est

rapporté au signal de la β_2 -microglobuline, et il est exprimé en taux relatif d'ARNm total de la GGT. Les résultats sont présentés dans la Figure 21.

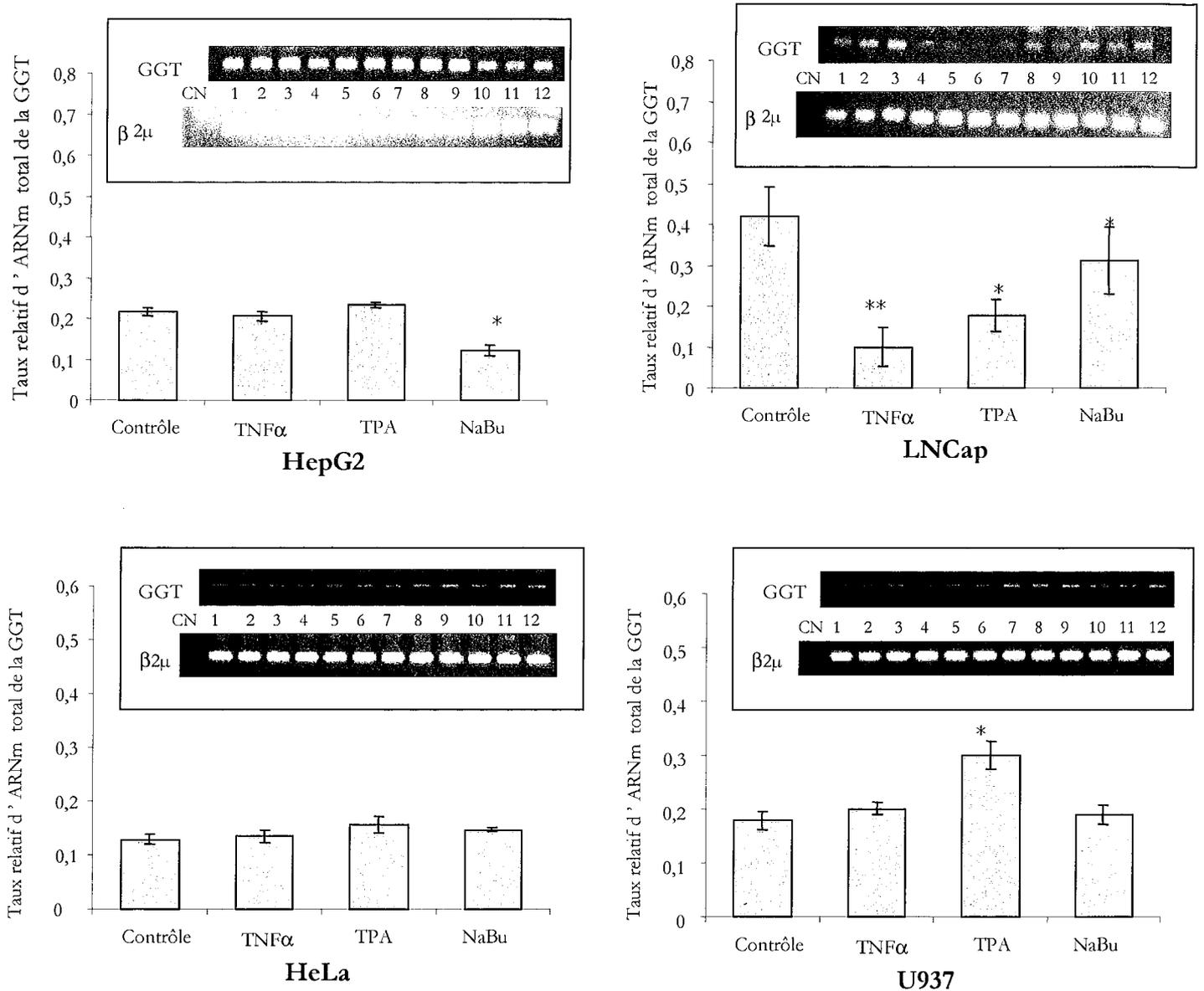


Figure 21 : Modulation du taux d'ARNm total de la GGT. 4 μ g d'ARN total extrait des cellules HepG2, LNCap, HeLa et U937 ont été soumis à une transcription inverse suivie des PCR spécifiques (matériel et méthode section 2.6.2). Les produits de PCR pour la β_2 -microglobuline et pour l'ARNm total de la GGT ont été quantifiés après migration sur gel d'agarose. Le taux relatif d'ARNm total de la GGT est obtenu par le ratio « signal GGT/signal β_2 -microglobuline ». Les données présentées correspondent à la moyenne \pm l'écart type pour 3 expériences. En insert : photographies des gels d'agarose utilisés pour la quantification des signaux : CN : contrôle négatif (PCR effectuée avec les 2 couples d'amorce, mais sans produit de transcription inverse); lignes 1 à 3 : cellules contrôles (cellules non traitées); lignes 4 à 6 : cellules traitées au TNF α 200 U/ml; lignes 7 à 9 : cellules traitées au TPA 2 μ M; lignes 10 à 12 : cellules traitées au NaBu 2,5 mM; * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$ par rapport aux cellules non traitées (contrôle).

- Dans la lignée HepG2, seul le traitement au NaBu module significativement le taux d'ARNm I_T total en le diminuant d'environ 50 %. C'est d'ailleurs ce même traitement qui a le plus d'effet sur l'activité GGT puisqu'il la diminue d'environ 50 % également.
- Pour les cellules LNCap, tous les traitements ont pour conséquence une diminution du taux d'ARNm I_T de la GGT avec dans l'ordre d'efficacité croissante le NaBu (26 %) le TPA (58 %) et le TNF α (80 %). Là encore, le taux d'ARNm I_T est corrélé à l'activité GGT mesurée dans ces cellules (Tableau VI).
- En ce qui concerne la lignée cellulaire HeLa, aucun des traitements utilisés ne module de façon significative le taux de messagers de type I de la GGT. C'est d'ailleurs la seule lignée pour laquelle aucune modulation de l'activité GGT n'a été détectée.
- Enfin, seul le TPA augmente le taux d'ARNm I_T de la GGT dans les cellules U937, augmentation également corrélée à l'induction de l'activité par ce même traitement.

En conclusion, la modulation du taux d'ARNm I_T de la GGT varie en fonction du traitement de façon spécifique du type cellulaire. La seule donnée commune à toutes les lignées étudiées est que les modulations de l'activité GGT sont toujours corrélées aux modulations du taux d'ARNm I_T . Ceci suggère que l'expression de cette enzyme est régulée au niveau de ses ARNm, soit par modification de leur $\frac{1}{2}$ vie, soit par régulation au niveau transcriptionnel.

1.1.3. Modulation du taux des 3 sous types de messagers :

Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe au moins 3 sous types d'ARNm I de la GGT ne différant que par leur région 5' NT. Des études précédentes (Tsutsumi *et al*, 1996, El Yaagoubi *et al*, 1995) ont montré que plusieurs de ces ARNm sont retrouvés dans un tissu ou dans un type cellulaire donné. On peut donc supposer que la quantité de l'ARNm I_T mesurée représente la somme des sous types présents dans un type cellulaire précis. Ainsi, après un traitement, les modulations des différents sous types dans la lignée considérée contribuent aux variations du taux de l'ARNm I_T observées.

Il nous a donc paru important d'étudier indépendamment la modulation de chacun des 3 sous types qui constituent l'ARNm I_T. Etant donné que ces 3 sous types diffèrent par leur extrémité 5' NT, il est possible de les quantifier indépendamment en utilisant des amorces spécifiques choisies dans ces régions. La technique que nous avons utilisée a été adaptée d'après Tsutsumi *et al* (1996). Elle utilise un couple d'amorces spécifiques de chaque sous type. Pour augmenter encore la spécificité de la technique, et surtout sa sensibilité, les produits de RT-PCR sont soumis à un Southern blot utilisant une sonde particulière pour chaque sous type (cf matériel et méthodes section 2.8). La Figure 22 représente les résultats obtenus pour chacune de ces RT-PCR.

Les bandes correspondant aux tailles théoriques sont celles à 300 pb pour le sous type A, 308 pb pour le sous type B, et 386 pb pour le sous type C. Cependant, comme on peut le voir sur les photos des Southern blots en Figure 22, des bandes supplémentaires apparaissent. Ces bandes contiennent des séquences additionnelles de 220 à 250 pb dont l'origine et la fonction sont encore inconnues. Dans le cas du sous type I_A et I_C, il pourrait s'agir de l'intron séparant les exons III et IIc qui ne serait pas épissé (Visvikis *et al*, 2001). Ces bandes n'ont pas été quantifiées.

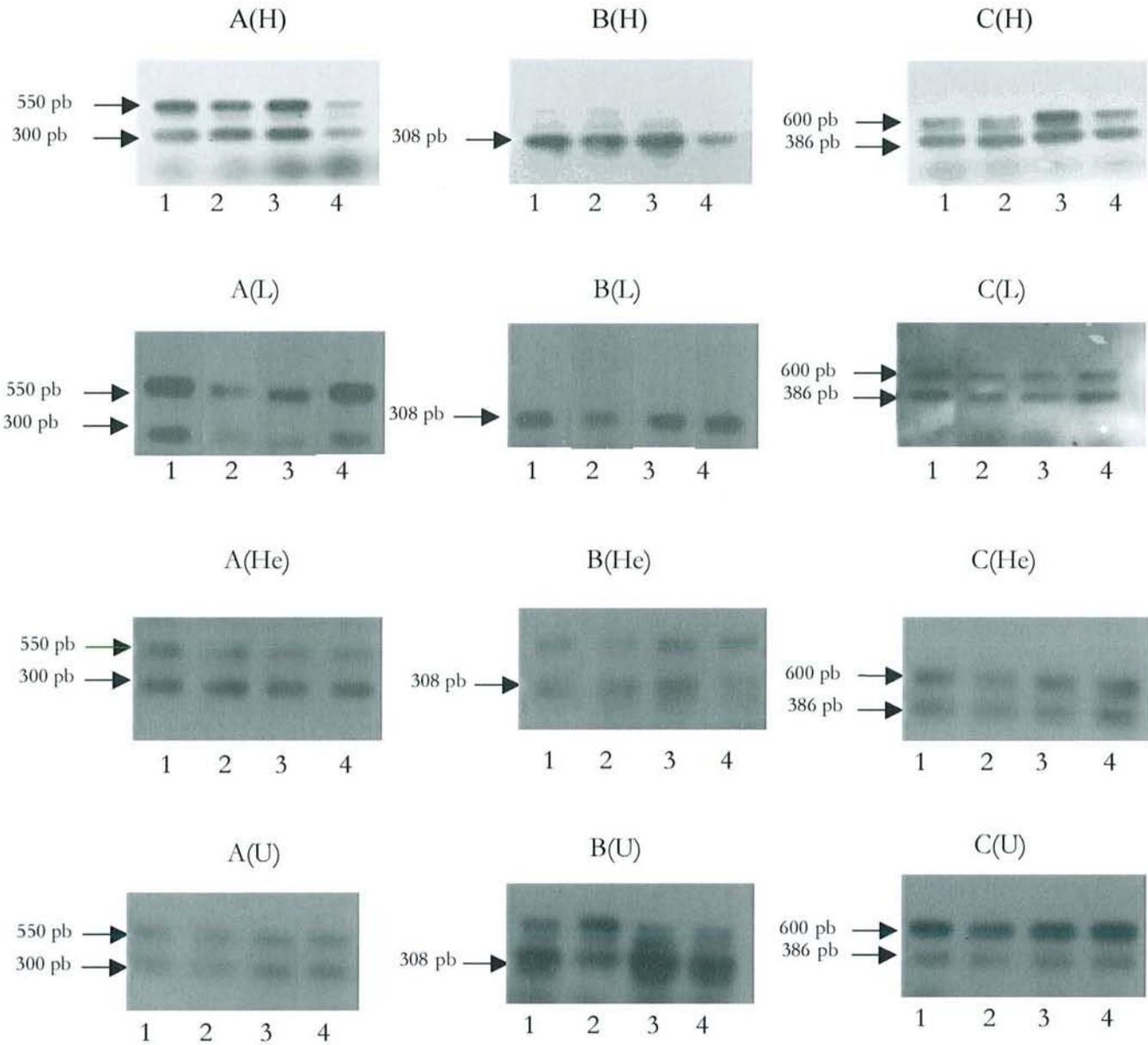


Figure 22 : Modulation du taux de chaque sous types. 4 μg d'ARN total extrait des cellules HepG2 (H), LNCap (L), HeLa (He) et U937 (U) ont été soumis à une transcription inverse suivie des PCR spécifiques et des southern blot utilisant les sondes spécifiques pour le sous type A : photos A (H), A (L), A (He) et A (U) ; pour le sous type B : photos B (H), B (L), B (He), et B (U) ; et pour le sous type C : photos C (H), C (L), C (He), et C (U). Ligne 1 : cellules non traitées ; ligne 2 : TNFα 200 U/ml ; ligne 3 : TPA 2 μM ; ligne 4 : NaBu 2,5 mM.

Pour plus de clarté, les résultats des quantifications des bandes d'intérêt normalisés par les signaux de la β₂-microglobuline sont récapitulés dans le Tableau VII. Les modulations sont représentées entre parenthèse par des flèches ascendantes, descendantes ou par un signe (=) et sont définies par rapport à la valeur obtenue sur les cellules non traitées.

Tableau VII : Modulation du taux de chaque sous types : résultats des quantifications

Traitements	Sous type de messager		
	A	B	C
<u>HepG2</u>			
Contrôle	0,59	1,08	0,71
TNF α	0,82 (\uparrow)	1,03 (=)	0,90 (\uparrow)
TPA	0,85 (\uparrow)	1,13 (=)	0,85 (\uparrow)
Butyrate	0,32 (\downarrow)	0,44 (\downarrow)	0,44 (\downarrow)
<u>LnCap</u>			
Contrôle	2,25	1,50	0,51
TNF α	0,40 (\downarrow)	0,44 (\downarrow)	0,18 (\downarrow)
TPA	0,50 (\downarrow)	1,13 (\downarrow)	0,07 (\downarrow)
Butyrate	1,60 (\downarrow)	1,40 (=)	0,30 (\downarrow)
<u>HeLa</u>			
Contrôle	0,67	0,74^a	0,29
TNF α	0,41 (\downarrow)	0,62 ^a (=)	0,31 (=)
TPA	0,53 (\downarrow)	1,05 ^a (\uparrow)	0,55 (\uparrow)
Butyrate	1,01 (\uparrow)	nd ^a (\downarrow)	0,64 (\uparrow)
<u>U937</u>			
Contrôle	0,66	1,43^a	0,71
TNF α	0,45 (\downarrow)	1,08 ^a (=)	0,61 (\downarrow)
TPA	0,65 (=)	2,75 ^a (\uparrow)	0,89 (\uparrow)
Butyrate	0,65 (=)	1,50 ^a (=)	0,75 (=)

^a: PARNm I_B a été détecté après 35 cycles de PCR (dans tous les autres cas, les quantifications sont réalisées après des PCR de 30 cycles).

En premier lieu, nous constatons que les 3 sous types sont présents dans toutes les lignées cellulaires étudiées mais que leur distribution relative est spécifique du type cellulaire. Ainsi, le sous type B est minoritaire dans les lignées HeLa et U937 (5 cycles supplémentaires de PCR sont nécessaires à sa détection) mais il est majoritaire dans les cellules HepG2 (ce qui est en accord avec le fait que ce sous type a été cloné à partir de cette lignée). Le sous type A est majoritairement exprimé dans les lignées cellulaires LNCap et HeLa alors que les cellules U937, expriment de façon comparable les sous types A et C.

L'analyse des résultats de quantification après les différents traitements montre que chaque sous type est régulé indépendamment des 2 autres, et de manière spécifique du type cellulaire. Ainsi :

- Dans la lignée HepG2, les traitements par le $\text{TNF}\alpha$ et par le TPA induisent l'ARNm I_A (1,4 fois) mais n'ont aucun effet sur le taux des sous type B et C. Le traitement par le NaBu entraîne une diminution du taux des 3 sous types d'environ 50 %. Ces variations expliquent d'ailleurs la forte diminution du taux d'ARNm I_T ainsi que celle de l'activité GGT dans la lignée HepG2 (50 %) après ce traitement.
- Dans la lignée LNCap, nous avons montré que chaque traitement était responsable d'une diminution du taux de l'ARNm I_T de la GGT, par conséquent d'une diminution de l'activité de cette enzyme (80 %, 58 % et 26 % pour respectivement le $\text{TNF}\alpha$, le TPA et le NaBu). Les résultats de la quantification des 3 sous types sont en accord avec ces modulations : on observe une diminution du taux de chaque sous type après les différents traitements, (sauf pour l'ARNm I_B qui n'est pas modulé par le traitement au NaBu).
- Dans les cellules HeLa, le $\text{TNF}\alpha$ ne modifie pas significativement l'expression des 3 ARNm I conformément au taux d'ARNm total ainsi que de l'activité GGT. Le TPA induit l'expression des sous types B et C, mais il est également responsable d'une diminution du taux de l'ARNm I_A qui est le sous type majoritaire dans cette lignée. Bien que le taux de chaque sous type varie, le taux d'ARNm I_T est conservé ainsi que le niveau de l'activité GGT après ce traitement. De même, le NaBu induit l'expression des ARNm I_A (1,5 fois) et I_C (2 fois), ce qui compense la diminution du

taux de l'ARNm I_B . Ainsi, l'activité GGT et le taux de son ARNm total ne sont pas modifiés par ce traitement.

- Dans les cellules U937, le traitement par le NaBu n'entraîne aucune variation significative des différents sous types. Par contre, le TPA induit l'ARNm I_C et multiplie par 2 le taux de l'ARNm I_B ce qui explique l'induction de l'ARNm I_T et de l'activité GGT (2 fois).

Il est important de retenir que :

- Lorsqu'on observe une modulation de l'activité GGT et de son ARNm total, elle est toujours corrélée avec la modulation de l'ARNm de sous type majoritaire dans la lignée concernée.
- Lorsque aucune modulation du taux d'ARNm total de la GGT n'est détectée, les traitements ont tout de même un effet sur l'expression des différents sous types et ces modulations individuelles contribuent à la stabilité du taux d'ARNm I_T et de l'activité GGT.
- Dans le cas du traitement des cellules HepG2 par le $TNF\alpha$ ou le TPA, nous avons mis en évidence une légère induction de l'activité GGT, sans pour autant détecter une augmentation significative du taux d'ARNm total. Cependant, il apparaît clairement que les ARNm I_A et I_C sont induits par ces traitements alors que le taux d'ARNm I_B (majoritaire) reste stable.

Sans apporter de réelles explications sur les mécanismes moléculaires de régulation de la GGT humaine, cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence certains de leurs aspects :

- ✓ **Les modulations de l'activité GGT sont toujours corrélées avec celles de l'ARNm I_T ce qui suggère une régulation au niveau de la synthèse de l'enzyme.**
- ✓ **Les variations de chaque sous type contribuent aux modulations de l'ARNm I_T et donc de l'activité de l'enzyme.**
- ✓ **Enfin, les variations indépendantes de chaque sous type, ainsi que leur régulation spécifique du type cellulaire, suggèrent fortement l'existence de promoteurs indépendants pour chacun de ces messagers (comme c'est le cas pour le rat et la souris).**

Il nous a donc paru important d'approfondir cette étude, d'une part en localisant et en caractérisant de nouveaux promoteurs sur le gène I de la GGT humaine et d'autre part en recherchant les éléments de réponse aux différents stimuli.

Ces résultats ont fait l'objet de la publication suivante :

« Differential regulation of gamma-glutamyltransferase mRNAs in four human tumour cell lines ». *Biochim Biophys Acta.*(2001), 568: 67-73.

Daubeuf S, Accaoui MJ, Pettersen I, Huseby NE, Visvikis A, Galteau MM.

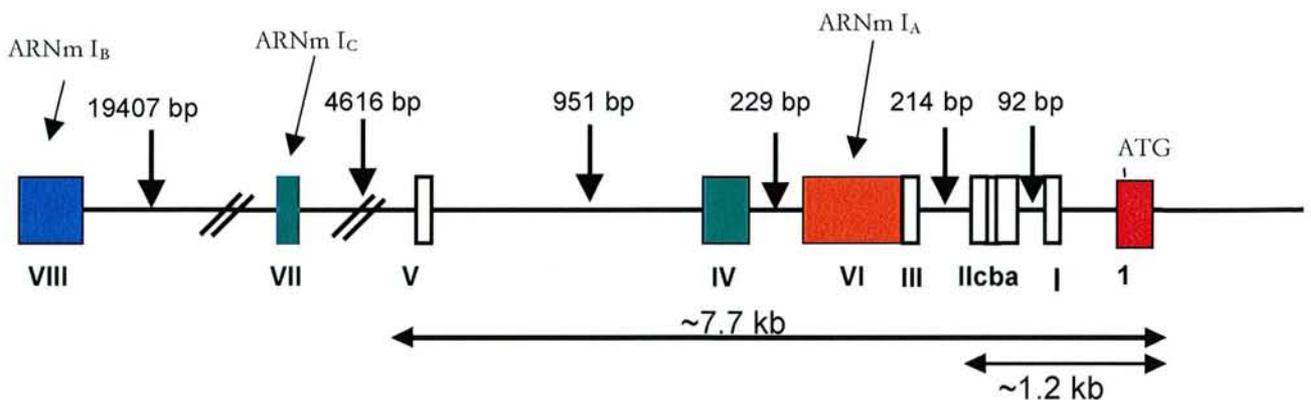
Qui est présenté à la fin de la première partie de cette thèse.

1.2. Recherche du promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm de sous type C

1.2.1. Introduction

Les résultats obtenus dans la partie 1.1 suggèrent très fortement que la transcription de chacun des messagers de sous type I est sous le contrôle d'un promoteur indépendant. Jusqu'à présent un seul d'entre eux a été décrit, celui qui dirige la transcription de l'ARNm I_B (Visvikis *et al*, 2001). Nous avons décidé de démontrer que les ARNm I_C étaient sous le contrôle d'un promoteur différent. Nous appellerons ce promoteur «promoteur C». Nous avons choisi de rechercher ce promoteur pour les raisons suivantes :

Si l'on observe la structure de la région 5' du gène de la GGT, on remarque que l'exon VI, spécifique des ARNm I_A, et l'exon IV sont séparés par un intron de 229 pb. En amont de l'exon IV, on retrouve un intron de 951 pb. Il nous paraît peu probable que l'ensemble de ces séquences corresponde à un promoteur contrôlant la transcription des ARNm I_A. De plus, l'exon VI ne montre pas d'homologie avec les premiers exons (exon « leader ») des ARNm de la GGT de rat et de souris. Par contre entre l'exon VII, spécifique des ARNm I_C et l'exon VIII, on trouve un intron de 19,4 kb qui pourrait contenir des séquences promotrices. De plus, l'exon VII est homologue à 76% et 81% à l'exon leader IV de souris et à l'exon leader III de rat respectivement.



Rappel de la structure de la région 5' NT du gène I de la GGT humaine.

La Figure 23 présente la démarche expérimentale adoptée pour cette étude.

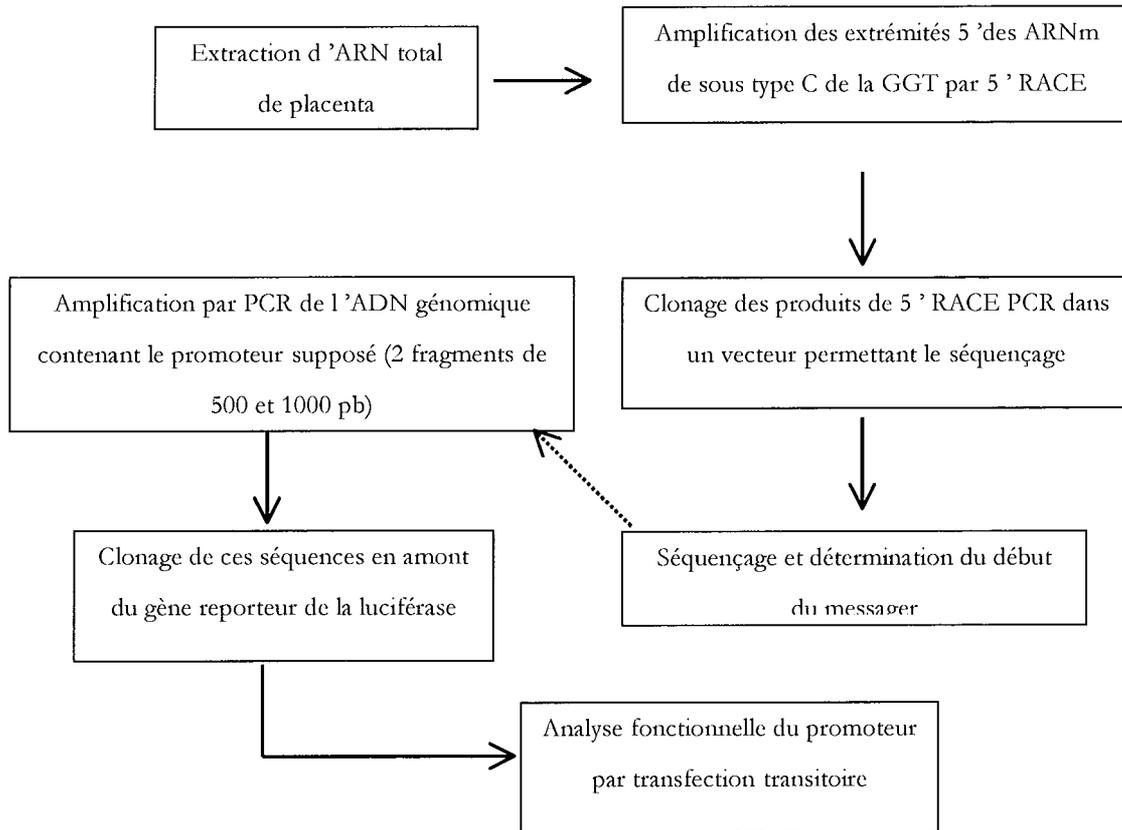


Figure 23 : Recherche et caractérisation du promoteur contrôlant la transcription de l'ARNm de sous type C de la GGT : démarche expérimentale.

L'ARNm I_C ayant été cloné à partir d'une banque d'ADNc de placenta, nous avons utilisé de l'ARN total extrait à partir de ce tissu pour effectuer les expériences de 5'RACE (matériel et méthodes section 2.7). Les produits obtenus ont été clonés dans le vecteur pCR4-TOPO, et les plasmides hybridant la sonde spécifique pour la région 5' non traduite de l'ARNm I_C (prom3) ont été séquencés. Le début de l'ARNm ainsi déterminé, nous avons construit des vecteurs contenant le promoteur potentiel en amont du gène reporteur de la luciférase et nous avons réalisé des expériences fonctionnelles par transfections transitoires dans les lignées HeLa et HepG2.

1.2.2. Expériences de 5' RACE

La Figure 24 présente la séquence correspondant à la région 5' non traduite de l'ARNm de sous type C. A partir de cette séquence et à l'intérieur de l'exon VII nous avons choisi 3 oligonucléotides, prom1, prom2 et prom3 dont les positions sont indiquées sur la Figure.

```

CCAGACCGGGCGTCG CGTCAGCCCGAAGTCAGACCGAGTTGGC TGTGCC_ 51
                                prom3
CAGTGCTGTGTGACCCAGAGGCCGCTCACCTCTCTGAGCTGGTGGAC 101
    prom2
ATCATAGCGGGTGCAGCCAAAAGTGTCTTCTGAGGAAGAGGTGCTCTCC 151
TGGGCCCCCACTGTCCCAGGCCTCAGATGCTGCATATTGCTGGCCCAGC_ 201
                                prom1
TCCTGAGGCTCTTTGGACCTCCAGGAATCGGTGTCTCTATCAGGAACCCT 251
TAACCCTGACCCGGACTCCCAGCTGGGACCCGGGGTGTCCGAGTGGCAA 301
GCGCTGTCAGGCCTGGTGAAGAGTGTGAGCTGTCCAACGGTGCAGGGAGG 351
AGGCAGGGCCTGTTCTGCAGTTGGACAGACAGAGCCCTCTAGCTGCTTTC 401
TGAAGACTGAAGGGCAGCAAGGCAAGTGAGGTGCTGCCGTCATCCAGGC 451
TGGACAGTTCAGTGATTTGCCTGAGGCCCCACAGCAGGAGAACGAGAAGG 501
CTGCCTGATCAGAGAGTCCCTGAAGAAGATTCTGTGGCTACAGGCTTCAG 551
CAGAGTGTGAGGGAGACCCCGGTTATTTCCCTCAGCTATTTCCACCAAATC 601
CTCCTGTCTTTTCGTGGCCAACACCCAGGCAAGGCTTGGGGCCCCCGTCT 651
GCTGCTGGACGCAGAGCC ATGAAGAAGAAG 681
                        Codon initiateur
  
```

Figure 24 : Région 5' non traduite de l'ARNm de sous type C, choix des amorces pour la 5' RACE et de la sonde pour le southern blot. La séquence surlignée correspond à la séquence reconnue par la sonde Prom3 utilisée pour le southern blot ; la séquence soulignée correspond à la séquence complémentaire de l'amorce prom1, et celle soulignée 2 fois à la séquence reconnue par l'amorce prom2. Le codon initiateur est présenté en gras souligné.

Le protocole de la 5' RACE utilise une amorce non spécifique en 5' et une amorce spécifique du gène en 3'. Afin d'augmenter la spécificité de la réaction, nous avons effectué une amplification en 2 étapes. La 1^{ère} utilise l'amorce prom1, et la seconde, réalisée à partir des produits de la 1^{ère} PCR utilise l'amorce prom2 comme amorces spécifiques du gène.

Les résultats de ces 2 PCR sont présentés sur la Figure 25.

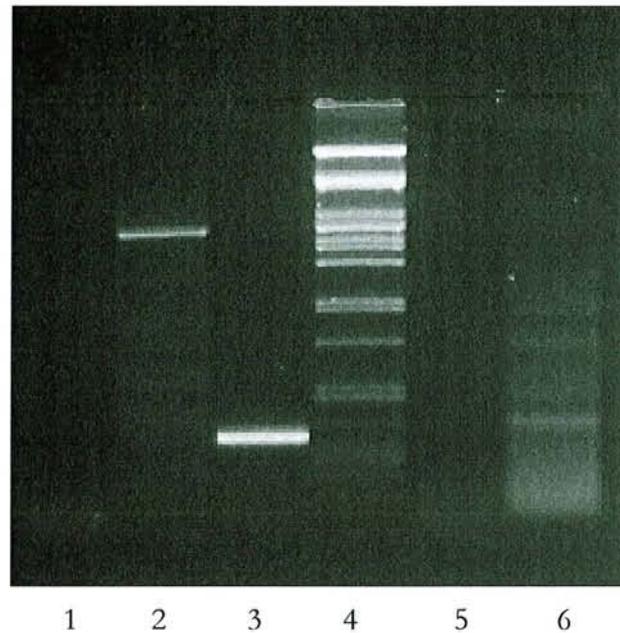


Figure 25 : Résultats de la 5' RACE. 1 μ g d'ARN total de placenta a été soumis à une transcription inverse puis à une PCR selon le protocole défini par le fournisseur (kit «SMART RACE cDNA amplification», Clontech) (section 2.7 du matériel et méthode). Les contrôles sont réalisés à partir de l'ADNc contrôle fourni dans le kit en effectuant une PCR dans la région 5' non traduite et dans la séquence codante du gène du récepteur à la transferrine (ligne 2 et 3). Ligne 1 : contrôle négatif réalisé sans ADNc ; ligne 4 : marqueur de taille ; ligne 5 : produits de la 1^{ère} PCR utilisant l'amorce prom1 ; ligne 6 : produits de la 2^{ème} PCR utilisant l'amorce prom2.

Les bandes obtenues pour les PCR contrôles (effectuées à partir de l'ARN et des amorces fournis dans le kit) correspondent aux tailles théoriques attendues ce qui montre que les conditions de PCR choisies sont optimales.

Après la 1^{ère} PCR utilisant l'amorce prom1, (piste 5), nous amplifions très peu de séquences (les produits sont indécélables par coloration au bromure d'éthidium sur gel d'agarose). Par contre, la seconde PCR en utilisant l'amorce prom2 (piste 6) amplifie des fragments de tailles variables. Ces expériences répétées plusieurs fois ont donné le même résultat. L'hybridation de ces produits de 5'RACE avec l'oligonucléotide prom3 ne nous a pas permis d'identifier un ou plusieurs fragments spécifiques. Nous avons donc décidé de cloner la totalité des produits d'amplification et d'identifier les séquences correspondant à la région 5' NT de l'ARNm I_C par hybridation sur les plasmides recombinants.

1.2.3. Clonage et séquençage des produits de 5' RACE

Les produits de PCR obtenus après la 2^{ème} PCR ont été clonés dans le vecteur pCR 4-TOPO. Après transformation de bactéries compétentes, par les produits de ligation, les colonies bactériennes résistantes à l'ampicilline sont utilisées pour effectuer des mini-préparations d'ADN plasmidique.

40 clones ont été choisis, et les 40 plasmides obtenus ont été digérés par l'enzyme de restriction *EcoRI* qui libère l'ADN inséré (la carte de restriction du plasmide PCR 4-TOPO est présentée dans le matériel et méthode section 2.1). Après migration sur gel d'agarose, l'ADN a été transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec l'oligonucléotide prom3 spécifique de la région 5' non traduite de l'ARNm I_C (Figure 26).

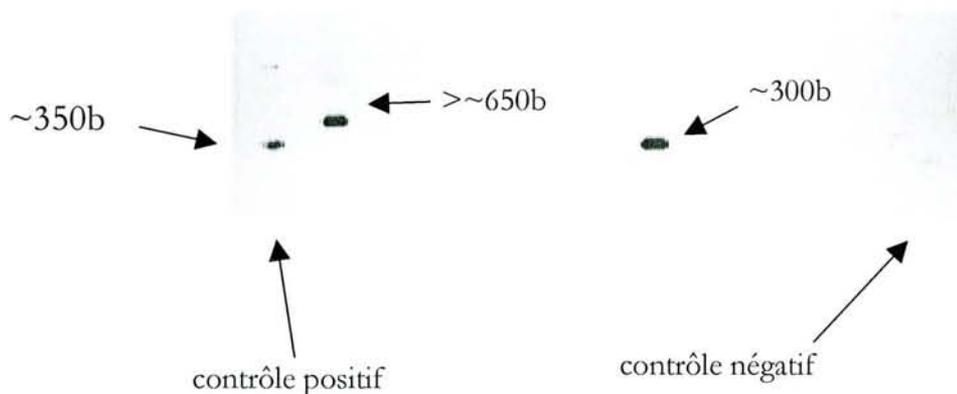


Figure 26 : Southern blot sur les produits de 5' RACE clonés dans le pCR-4 Topo digéré par *EcoRI*. Les plasmides PCR4-Topo contenant un insert ont été digérés par l'enzyme *EcoRI* qui libère l'insert. Les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose et soumis à un southern blot utilisant la sonde Prom3. Le contrôle positif correspond à un fragment de la région 5' NT de l'ADNc I_C (Rajpert De Meyts *et al*, 1988), et le contrôle négatif contient des séquences n'ayant aucune homologie avec la GGT.

Sur les 40 clones examinés, seuls deux se sont révélés positifs malgré la succession des deux PCR spécifiques. De plus ces deux fragments d'ADN ont des tailles différentes, environ 650 et 300 pb. Ces résultats laissent supposer qu'il existerait plusieurs sites d'initiation de la transcription pour cet ARNm. Nous avons ensuite déterminé la séquence de ces deux clones qui est présentée dans la Figure 26.

Clone 1 à partir de l'amorce – 21 (sens)

(X7) **AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG** GA CCAGA

Clone 1 à partir de l'amorce Rev (antisens)

TCTGGGTCACACAGCACTGGGGCACAGCCAACTGCTCTCACTTCTGGGCTCACC
CGACGCCCGGTCTGG TC CCCGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCT (X 5)

Clone 2 à partir de l'amorce – 21 (sens) :

(X6) **AGCAGTGGTGCAACGCAGAGTACGCGGG** GA CCAGA

Clone 2 à partir de l'amorce Rev (antisens) :

TCTGGGTCACACAGCACTGGGGCACAGCCAACTGCTCTCACTTCTGGGCTCACC
CGACGCCCGGTCTGG TC CCCGCGTACTCTGCGTTGATACCACTGCT (X 8)

Figure 27 : Résultat du séquençage des 2 clones. Les séquences en italique correspondent aux séquences spécifiques de la GGT. Les séquences en italique soulignées deux fois correspondent aux séquences additionnelles présentes aussi sur le gène. Les séquences en gras correspondent à la séquence de l'amorce SMART II A du kit répétée plusieurs fois (le nombre est précisé entre parenthèses).

Les résultats du séquençage sont quelque peu déroutants. En effet, les séquences de deux clones comprennent la région 5' NT de l'ARNm I_C (en italiques sur la Figure 27), deux bases supplémentaires qui sont aussi présentes sur le gène en amont de l'exon VI (en double souligné) et enfin 5 à 8 répétitions de l'amorce aspécifique utilisée pour la synthèse du deuxième brin d'ADN et pour les réactions de PCR (en gras). Nous ne pouvons pas expliquer pourquoi plusieurs copies de l'oligonucléotide aspécifique ont été incorporées ni à quelle étape du clonage, mais cette addition aléatoire peut expliquer le profil diffus obtenu après la deuxième PCR. En effet on doit être en présence de fragments avec cette séquence additionnée un nombre variable de fois. L'extension de deux bases seulement de l'ARNm I_C est concevable si on tient compte que cette région présente une grande homologie avec les exons «leader» des ARNm III de rat et IV de souris. Donc l'exon VII est réellement un exon «leader», la région sur le gène juste en amont de cet exon devrait correspondre au promoteur recherché. Nous avons donc décidé de cloner cette région et de la caractériser.

1.2.4. Clonage des séquences contenant le site potentiel d'initiation de la transcription de l'ARNm de sous type C

La séquence de la région en amont de l'exon VII est présentée dans la Figure 28.

```

-1081 AGGGTGGTCAAGAGGTCCCCTGCAGCCCTCACTTCTGGAAAAGGCTCCA -1032
-1031 TTTCTGGCCTTCAGGCTCAGGTGGTTCCTTCCGCTGGCAGGTCTCTCC -982
      « CAAT BOX »
-981 CAAATCCAATCCCAGCTCGGGCTGGATTCCCAAGGCCCTATTCTGGTGT -932
                        AP1
-931 CTGCCCCCTCCCTAGGGCTCTTCCCCCTGGGGTGACCATACTCTCATGCC -882
-881 CAGCCAGGTCAGGGCTCCTTGAGAGAAGAATCTGGAGGGGCCAGGATTTG -832
                        prom 856
-831 ATGGGAGAATGAATGATGGAATGAAAGAAGGAACGTAAGCGTGAGCCTTG -782
-781 CTAAGAGTGACAATACTGGCAGGCTGCAGACCATGTGTGGACCTCGATCT -732
-731 GAGGGCTTAGAGGCTTCGGCCTGCCAGCGCTGTGGGGGCACCCACCCCAT -682
-681 CTCATTGAATGGGGCAGAGCAGGTGAGGGCATGAGATGGACAGATGGGCC -632
-631 TCATCCCCCTGCTTCCGTTGCCTGGGGTCCCTCGGTCAGCCTGTTTGCTCA -582
                        AP1
-581 GACCCCTGAAATTGGGGGTCAAGGAAGGACCCTCCTGGATTATTGTGACTC -532
                        AP1                AP1
-531 CCTTCAGTCCAGGTGACCAGGGTCCTTGGAGTGACAGCTCCTAGAGCCCC -482
                        Prom 489
-481 ACCTGTAGTCCTGCAAGCTGGGGAGAGGGCCTGTTAGGAGAGGCATCCCC -432
-431 TGCCCTGGGGTTGTAGAGGTGAACTAGGCTCCTCAGACCTTGTGGGGCCT -382
                        XRE
-381 CAGATGCTTACATCTCCAGCCCCCTCCTGGCGTGGGCATCTGGCTGCAGCC -332
-331 CAGCTCTGTGGCCCCATCTCCAGGGAACCTTTGGTCTAATCTGCCTCCC -282
-281 GCTGAAACCCAGCCTCATTAGCCCCACCGAGGCTTTCAGAGTTCAGGTC -232
-233 TCTCATTAGGGTTTGAGACCCACCGGGCTCAGAGACACCTGCAGCCTG -182

```

```

-181 CAGCGGTCCCAGATCACAGCCTCAGGGATGGGACCAGGAGCCAGCCCACA -132
                                     BARBIE BOX
-131 TCCCACCTGCAGCAGTTCCTGTGCCTTTAAAGCCTCCCCCCCCGCC -82
      SP1                               TFIID BINDING
-81  CGCCCCAGGCCACTAGGGGAGGGAAGGAGGAGCTGGGTCACAGCAGGGA -32
                                     + 1
-31  ATCTTAGCTTGGTTTTTGGTGTGCTGCTGGAT G ACCAGACCCAGACCGGGC +19

+20  GTCGGGTGAGCCAGAAGTGAGAGCAGTTGGCTGTGCCCCAGTGCTGTGT + 68
                                     prom 2
+ 69 GACCCAGAGGCGCCGCTCACCTCTCTGAGCTGGTGGAC

```

Figure 28 : Séquence partielle du promoteur contrôlant la transcription des ARNm GGT I_C. Le site potentiel d'initiation de la transcription correspond aux résultats de la 5'RACE. Les amorces utilisées pour le clonage sont soulignées. Une « CAAT box » en position équivalente à celle du promoteur III chez le rat est indiquée en gras et souligné. Les différents sites consensus potentiels sont indiqués en gras. Les positions des amorces utilisées pour l'étude de cette région sont soulignées.

La première base de la séquence de l'exon VII que nous considérons comme le début de la transcription (+1) est indiquée en caractère gras. L'analyse de la séquence présentée en Figure 28 par le logiciel MatInspector a révélé la présence à proximité du site potentiel d'initiation de la transcription un site pour la fixation du facteur SP1 impliqué dans l'initiation de la transcription. Un site XRE (xenobiotic response element) connu pour fixer le facteur AhR/ARNT en réponse à des inducteurs chimiques bifonctionnels est également présent à la position - 356 à - 350. L'analyse a également révélé la présence de 3 sites pour la fixation de AP1 situés à proximité les uns des autres ainsi qu'une séquence potentielle pour la réponse aux barbituriques (BARBIE box). La comparaison de la séquence avec le promoteur P3 de rat révèle la présence d'une séquence très bien conservée entre les deux espèces (TFIID-binding) qui fixe le facteur TFIID et est impliquée dans l'initiation de la transcription de l'ARNm III de la GGT de rat.

Pour le clonage de cette région à partir du gène, nous avons choisi d'utiliser l'amorce prom2 qui reconnaît une séquence spécifique de la région 5' non traduite de l'ARNm de sous type C et à l'extrémité 3' de cette amorce, nous avons ajouté un site de restriction pour l'enzyme *Hind* III. Les deux autres amorces ont été choisies en amont de l'amorce prom2 de façon à amplifier deux fragments différents d'environ 600 pb (fragment pGGT C_{.489}) et d'environ 950 pb (fragment pGGT C_{.856}). Aux extrémités de ces deux amorces est rajouté un site de restriction *Xho* I. Ainsi,

on pourra cloner les produits de PCR dans le plasmide pGl3 enhancer aux sites *Hind* III/*Xbo* I en amont du gène de la luciférase.

1.2.5. Etude de l'activité promotrice des fragments pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆

Les plasmides contenant les fragments pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆ en amont du gène de la luciférase ont été utilisés pour la transfection transitoire des cellules HeLa.

La Figure 29 présente les résultats :

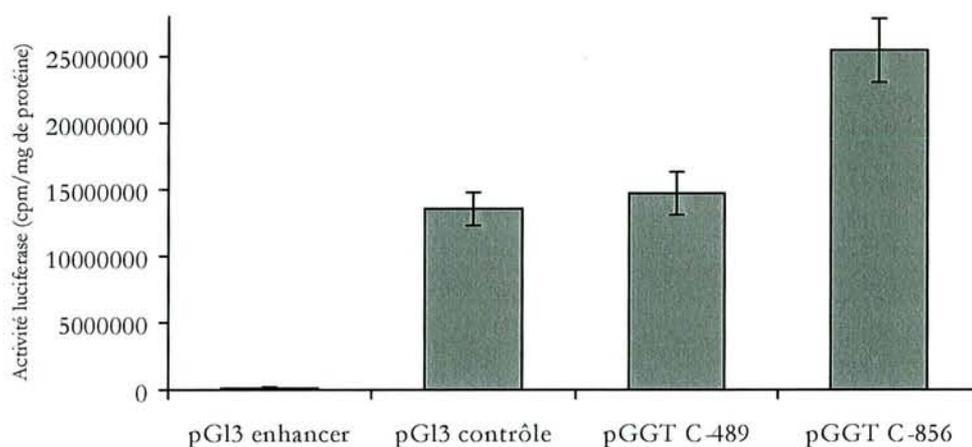


Figure 29 : Activités promotrices des fragments pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆ dans la lignée cellulaire HeLa. Les cellules ont été transfectées par 5 µg des plasmides pGl3 enhancer (témoin négatif), pGl3 contrôle (contrôle positif), pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆ en utilisant le réactif superfect (Gibco). 24 heures après la transfection, les activités luciférase ont été mesurées. Les résultats exprimés en cpm/mg protéines correspondent à la moyenne et l'écart type calculés pour 3 essais.

La transfection par le plasmide pGl3 enhancer sert de témoin négatif (car ce plasmide ne contient pas de séquence promotrice en amont de la luciférase). Le plasmide pGl3 contrôle possède lui un promoteur fort (le promoteur SV40) qui contrôle l'expression de la luciférase et nous sert de contrôle positif.

Les mesures de l'activité luciférase montrent que, le fragment - 489 à + 71 possède une activité promotrice aussi forte que le promoteur du plasmide contrôle (provenant du virus SV40). Quant au fragment incluant les séquences jusqu'à - 856, il montre une activité promotrice 1,7 fois supérieure à celle du fragment pGGT C₋₄₈₉.

Il paraît alors clair que nous avons mis en évidence un nouveau promoteur sur le gène I de la GGT humaine. Ce promoteur serait responsable du contrôle de l'expression de l'ARNm de sous type C. Chez l'homme, comme chez le rat ou la souris, l'expression du gène de la GGT est contrôlée par plusieurs promoteurs.

1.3. Etudes fonctionnelles des promoteurs B et C de la GGT humaine

1.3.1. Etude fonctionnelle du promoteur B en réponse au traitement par le TPA

Comme nous l'avons montré dans la première partie de notre étude, le traitement par le TPA induit l'expression de l'ARNm I_b dans plusieurs lignées cellulaires. Dans certains cas, le TPA induit la voie d'activation de la transcription des gènes via le facteur de transcription AP1. Plusieurs sites de reconnaissance pour AP1 sont présents sur la séquence promotrice présentée dans la Figure 30 (promoteur B) . Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de la GGT par le TPA, nous avons étudié le rôle de ces différents sites lors de la réponse à cet agent.

-780	CTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGCACCCACCACCACGCTGACTAA	-721	AP1
			YY1
-720	<u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> TAGTAGAGATGGGGTTTTGCCATGTTGGCCAGCCTGGTCTTGA	-661	
-660	ACTTCTGACCTCCACCCGCTCGGCTCCCAAAGTGCTGGGACTACAGGCATGAGCCACG	-601	
-600	CCGCCTGGCCAACAAGTCCCCTTAACCTCTTTCTGCCTCAGTCGACTCACCTGGAAAAACA	-541	
-540	GAGCACCTACCTCCTTCAAATGAGAAGAGAAGTAAAGGAGTATAAGGCCATCAGAACAGT	-481	
	AP2		
-480	ACCTGGCCCAAGGGAGGCTATGGAAGTGCTTGTGAATAAAAAAATGGCTTCATCTCTGG	-421	
-420	CCTAGCCCCAAAGGTTTGAGTTCCTGCCATTGCCACCCAGACAGCCCTGGGTGGAGGCC	-361	
	AP1		
-360	<u>TGCTGACATTGAAGAGTGCCTGCCCTCCTCCCCTCAATGCGGTAGACACTTTCCAAAAC</u> T	-301	
	CREB	GATA	SP1
-300	<u>TACGTCATCCTCACTCTCACTCCAGTGGGATAATGGGAGGCTTGGTGACCTCATTCCCA</u>	-241	
	AP1	ARE ?	
-240	AGATGAGGGAACAGGCTCTGAGAGGACCACATCGCCAGCAAGTGACAGGCTGGGACCAAG	-181	
	SP1	AP1	
-180	GCCAGGCCTGTCTGCCTCCTAGACTAGGCCTGAGTGAGGACCGGCTGAGTATGGCCAC	-121	

-120 CTGCTTCCTCCTCCGTTTAGAGCTTGGGCTGGAGCTGTCCTGGCCAGTGCTCTCTGCCTC -61
 -60 ACCAGGCTGCATGAGCCACAAGCTGCCACTTGTGGAGCTCGGTGGCCCTGCCCTCGACAG -1
 +1 CCTTGCTGGTGGTTCGTGAAGGCTCTAAACACCTGCATGGCAATGAGGCCAACCTTCTCCG +60

Figure 30 : Séquence partielle du promoteur B. Les sites potentiels de fixation de divers facteurs de régulation sont soulignés

A proximité du site d'initiation de la transcription (de - 240 à - 125) se trouvent plusieurs sites potentiels pour la fixation de AP1 ainsi qu'une séquence qui pourrait constituer un ARE (antioxydant response element). Deux autres sites AP1 sont situés un peu plus en amont aux positions - 360 à - 348 et -730 à - 718. Une représentation de la position de ces sites et de leurs séquences est présentée en Figure 31 ; leurs comparaisons par rapport aux séquences consensus sont présentées dans le Tableau VIII.

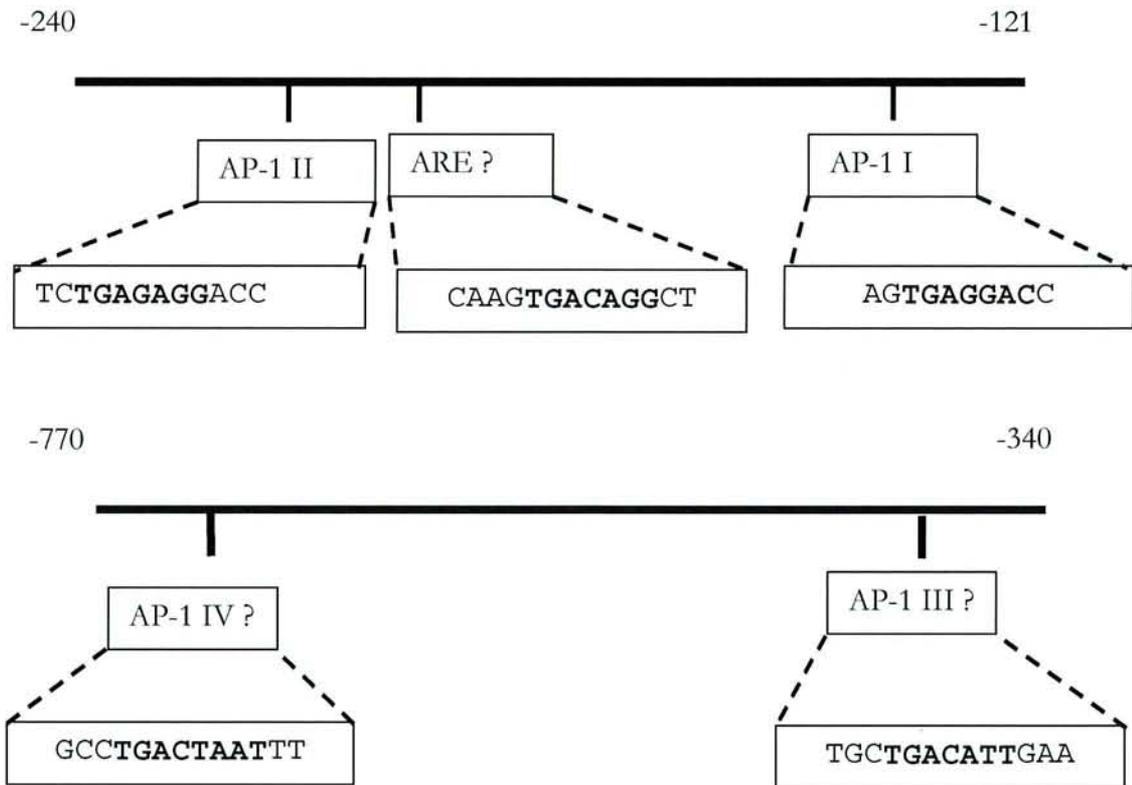


Figure 31 : Représentation des sites AP-1 sur la séquence promotrice contrôlant la transcription des ARNm GGT I_B. En gras sont indiqués les séquences « cœur » des sites de fixation.

Tableau VIII : comparaison des sites potentiels aux séquences consensus

	Séquences
AP1 consensus	TGAGTCA
AP1 I	AG TGAGG ACC
AP1 II	TCT GAGAG GA
AP1 III	GCT GACAT TG
AP1 IV	CCT GACTAAT T
ARE consensus	(A/G)TGA(C/T)NNNGC(A/G)
ARE GGT	CAAG TGACAGG CT

Pour l'étude du rôle des différents sites AP1 proximaux sur la modulation de l'activité promotrice par le traitement au TPA, nous avons utilisé les différentes constructions décrites par Visvikis *et al* (2001) et présentées dans la Figure 32 :

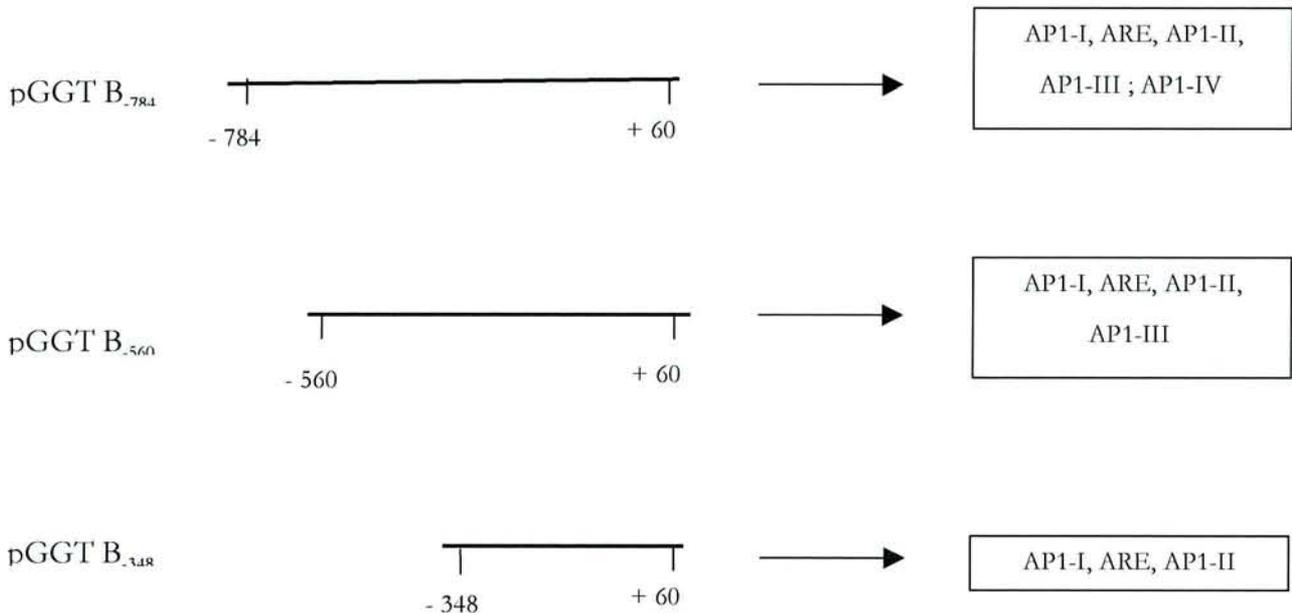


Figure 32 : fragments utilisés pour la construction des différents vecteurs reporteurs.

Les fragments décrits ci-dessus ont été clonés dans le vecteur pGL3 en amont du gène de la luciférase et utilisés pour la transfection des cellules HeLa et HepG2.

Ainsi, le plasmide pGGT B₃₄₈ contient les sites potentiels AP1-I, ARE, et AP1-II, le plasmide pGGT B₅₆₀ contient ces séquences plus le site AP1 III, et le plasmide pGGT B₇₈₄ comprend en plus le site AP1-IV.

Les cellules sont ensemencées en plaques 12 puits et transfectées à l'aide du réactif « Superfect » par les plasmides pTK-AP1, pGGT B₃₄₈, pGGT B₅₆₀ ou pGGT B₇₈₄. Après la transfection, les cellules sont traitées par du TPA à 2 µM pendant 18 heures ou non (contrôle).

Les résultats des transfections sont présentés en Figure 33 :

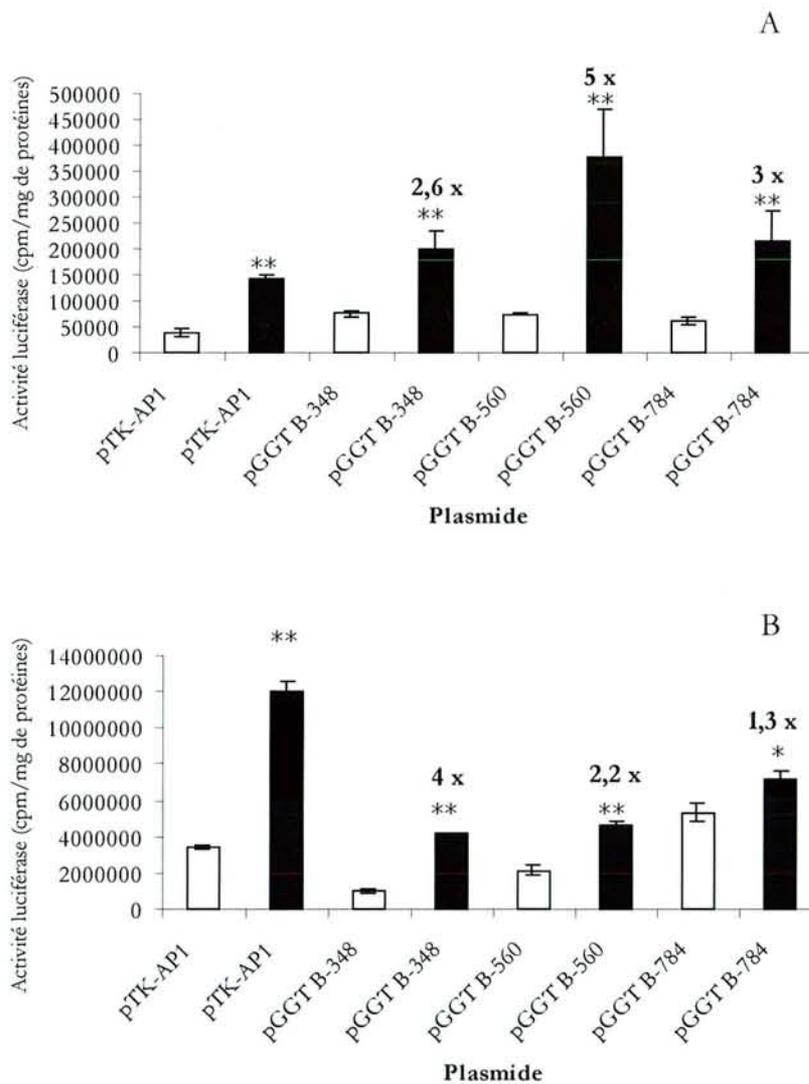


Figure 33 : Activités promotrices des différents fragments du promoteur B dans la lignée HepG2 (A) et dans la lignée HeLa (B) ; (□) cellules non traitées (■) cellules traitées au TPA
 * p < 0,001 ; ** p < 0,005 par rapport à l'activité promotrice du même plasmide dans la lignée cellulaire non traitée au TPA.

Comme le montre la Figure 33 A, l'activité promotrice de tous les fragments est comparable dans la lignée HepG2 non traitée. Le fragment le plus court (pGGT B₋₃₄₈) possède une activité promotrice aussi importante que le fragment pGGT B₋₇₈₄. Par contre, dans la lignée HeLa, l'activité promotrice augmente avec la longueur du fragment: de deux fois entre pGGT B₋₃₄₈ et pGGT B₋₅₆₀ et de 5 fois entre pGGT B₋₃₄₈ et pGGT B₋₇₈₄ (Figure 33 B).

Le plasmide pTK-AP1 contient dans sa région promotrice 4 sites de fixation pour le facteur AP1 en tandem. Après le traitement au TPA des cellules transfectées par ce plasmide, nous avons obtenu une induction de 3,4 et 3,7 fois pour les cellules HeLa et HepG2 respectivement. Comme le promoteur de ce plasmide ne peut être régulé que par AP1, ces résultats montrent que ce facteur est bien induit dans les deux lignées par le TPA.

Dans les deux lignées, et pour toutes les constructions utilisées, le traitement par le TPA induit l'activité du promoteur B. Dans la lignée HeLa, le TPA induit l'activité promotrice des fragments pGGT B₋₃₄₈, pGGT B₋₅₆₀ et pGGT B₋₇₈₄ de 4, 2,2 et 1,3 fois respectivement par rapport aux valeurs obtenues sans traitement. L'activité promotrice maximale est obtenue pour le plus long fragment pGGT B₋₇₈₄ après le traitement par le TPA. Dans cette lignée, l'activité promotrice dépend de la longueur du fragment, par contre, l'inductibilité par le TPA est la plus importante pour le fragment le plus court. Les séquences en amont de la position - 348 semblent inhiber l'induction par le TPA, il se peut que ces séquences contiennent un site de fixation pour une protéine qui limiterait la transactivation du gène par AP1.

Dans la lignée cellulaire HepG2, l'activité promotrice des fragments pGGT B₋₃₄₈, pGGT B₋₅₆₀ et pGGT B₋₇₈₄ est induite de 2,6, 5 et 3 fois respectivement par le TPA. Nous constatons donc que l'inductibilité de l'activité promotrice dépend de la longueur de la séquence. L'inductibilité maximale est obtenue pour le fragment pGGT B₋₅₆₀. Par contre, l'ajout des séquences comprises entre - 560 et - 784 résulte en une inhibition de l'induction par le TPA comme dans les cellules HeLa. Cette expérience montre que le promoteur B est induit par le TPA d'une manière dépendante du type cellulaire. Il se peut que les séquences comprises entre - 560 et - 784 pb contiennent des séquences reconnues par des facteurs capables d'interagir avec les sites AP1 proximaux.

Bien que le fragment pGGT B₃₄₈ possède une faible activité promotrice, tant dans les cellules HeLa que dans les cellules HepG2, il contient 3 sites potentiels pour AP1 et son activité promotrice est induite par le TPA dans les deux lignées.

Nous avons alors décidé d'étudier le rôle de ces 3 sites potentiels dans l'activation de la transcription par le TPA. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de retardement sur gel utilisant les facteurs nucléaires extraits des cellules HeLa et HepG2 traitées ou non par le TPA. La fixation de ces facteurs aux sites potentiels a été étudiée en utilisant des oligonucléotides contenant les séquences AP1-I, ARE ou AP1-II marqués.

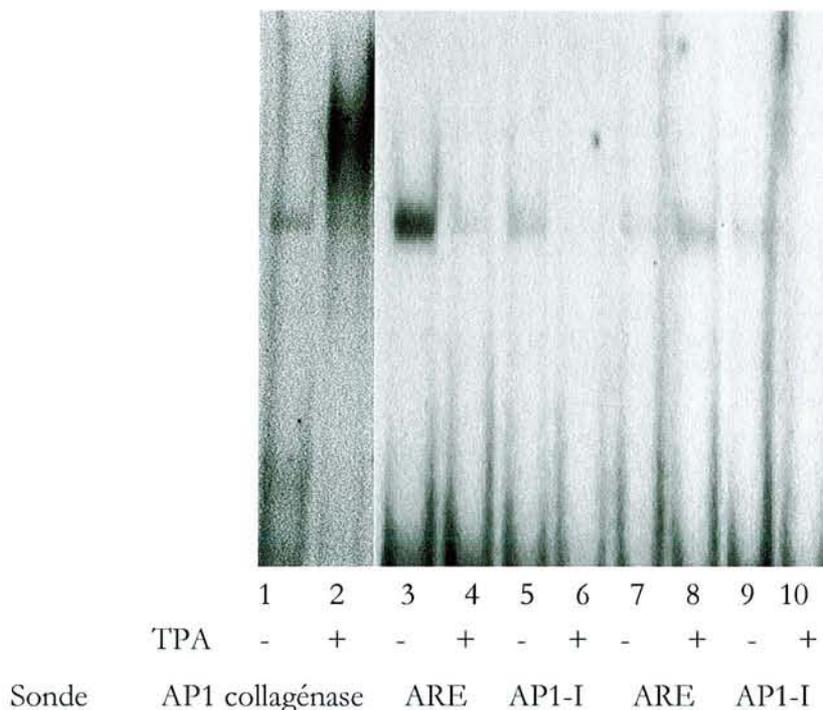


Figure 34 : Etude de la fixation des facteurs nucléaires aux sites potentiels ARE et AP1-1. 5 µg d'extraits nucléaires de cellules HeLa (pistes 1, 3, 5), HeLa traitées au TPA (pistes 2, 4, 6), HepG2 (pistes 7 et 9) ou HepG2 traitées au TPA (pistes 8, 10) sont incubés en présence 1 ng de la sonde AP1-collagénase marquée (pistes 1 et 2 contrôle), 1 ng de la sonde la sonde ARE marquée (pistes 3, 4, 7 et 8) ou 1 ng de la sonde AP1-1 marquée (pistes 5, 6, 9 et 10).

Les pistes 1 et 2 correspondent aux incubations des extraits nucléaires de cellules HeLa non traitées et traitées au TPA avec un oligonucléotide contenant la séquence du site de fixation AP1 du gène de la collagénase. Il s'agit d'un témoin positif car il a été démontré que cette séquence fixe spécifiquement le facteur AP1 composé de cJun et cFos (Steinmuller *et al*, 2001). Nos résultats montrent que les cellules HeLa contiennent peu ou pas du tout de facteur AP1 car sur la

piste 1 nous n'observons qu'une très faible bande correspondant à l'oligonucléotide retardé. Le traitement des cellules au TPA induit ce facteur ce qui se traduit par l'apparition d'une bande retardée de très forte intensité visible sur la piste 2. En tenant compte des résultats de transfection par le plasmide pTK-AP1, nous confirmons que dans les cellules HeLa, le traitement au TPA induit le facteur AP1 (fixation sur le site spécifique) et ce facteur est capable d'induire la transcription (transactivation). Pour les incubations des oligonucléotides dérivés des sites AP1-I et ARE du promoteur B du gène de la GGT (pistes 3 à 10) avec les extraits nucléaires des cellules non traitées et traitées au TPA, nous n'avons obtenu aucune bande équivalente à la précédente. Nous concluons alors que ces deux sites ne fixent pas le facteur AP1 induit par le TPA et qu'ils ne sont donc pas impliqués dans l'activation du promoteur. Si l'induction de l'activité promotrice par le TPA est due au facteur AP1 alors le site AP1-II en serait responsable. Cette hypothèse a été aussi vérifiée par des expériences de retardement sur gel dont les résultats sont montrés dans la Figure 35.

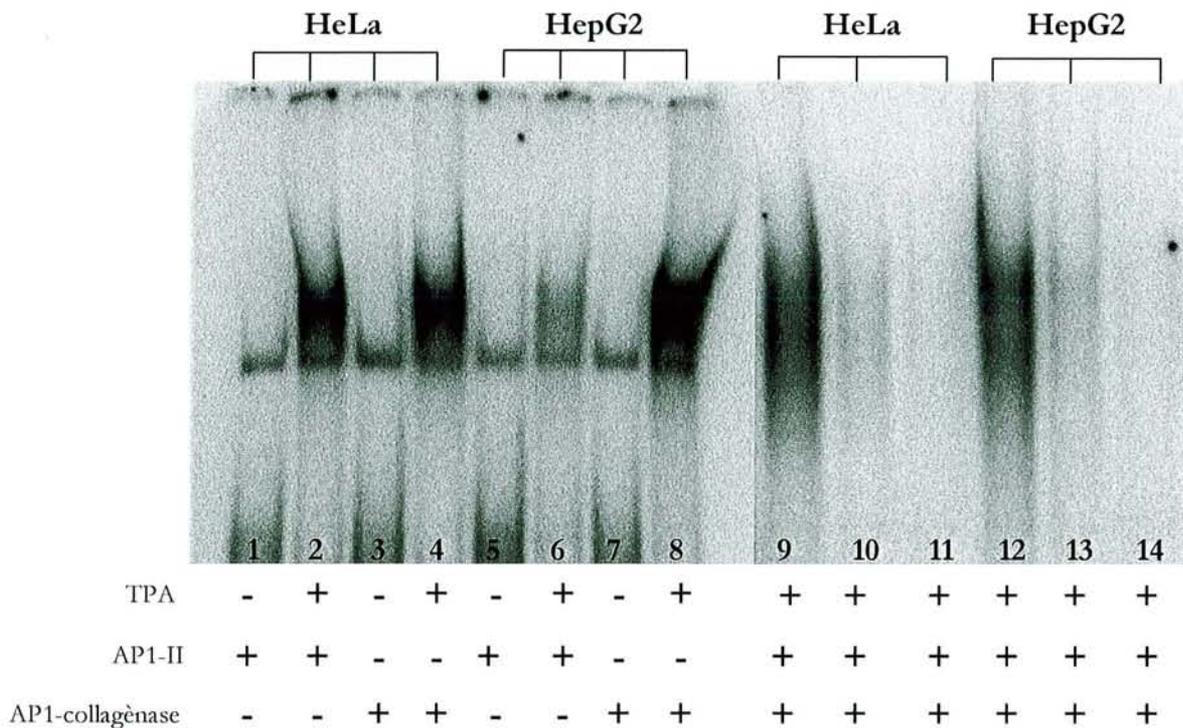


Figure 35 : mise en évidence de la fixation du facteur de transcription AP1 sur le site AP1-II 5 µg d'extraits nucléaires des cellules HeLa (pistes 1, 3) HeLa traitées au TPA (pistes 2, 4, 9, 10, 11), HepG2 (pistes 5, 7) ou HepG2 traitées au TPA (pistes 6, 8, 12, 13, 14) sont incubées avec 1 ng de la sonde AP1-II marquée (pistes 1, 2, 5, 6) ou de la sonde Ap1-collagénase (pistes 3, 4, 7, 8) et analysés par retard de migration sur gel. Des expériences de compétition sont réalisées en incubant les extraits nucléaires en présence de 1 ng de la sonde AP1-II radiomarquée et 0 ng (pistes 9 et 12), 20 ng (pistes 10 et 12) ou 100 ng (pistes 11 et 14) de la sonde AP1-collagénase non marquée.

Comme précédemment l'oligonucléotide dérivé du site AP1 du gène de la collagénase nous a servi de témoin positif (pistes 3, 4, 7 et 8). Pour les cellules HepG2 comme pour les cellules HeLa non traitées (pistes 3 et 7) aucune bande retardée correspondant à la fixation du facteur AP1 n'est observée. Au contraire, le traitement au TPA de ces deux lignées conduit à une très forte induction de ce facteur (pistes 4 et 8). L'oligonucléotide contenant le site AP1-II du gène de la GGT ne semble fixer spécifiquement aucune protéine des extraits nucléaires des cellules HeLa et HepG2 (pistes 1 et 5 respectivement). L'incubation de cette séquence avec les extraits des cellules traitées conduit à une bande retardée qui migre au même endroit que la bande obtenue avec la sonde dérivée du gène de la collagénase. Il est donc fort probable que ces deux oligonucléotides fixent le même facteur. Cette hypothèse a été vérifiée par des expériences de compétition. La sonde AP1-II marquée a été incubée avec les extraits nucléaires des cellules HeLa et HepG2 traitées au TPA et avec des concentrations croissantes de la sonde AP1-collagénase froide. Comme nous pouvons le constater sur les pistes 9 à 11 et 12 à 14, l'incubation avec la sonde AP1-collagénase déplace le signal radioactif ce qui indique que les deux séquences fixent le même facteur de transcription.

Si nous comparons maintenant les intensités des signaux des pistes 4 et 8, nous en déduisons que le TPA induit avec la même efficacité le facteur AP1 dans les cellules HeLa et les cellules HepG2. En revanche, si on compare les pistes 2 et 6, on peut en déduire que dans les cellules HepG2 le site AP1-II fixe avec moins d'efficacité le facteur induit que dans les cellules HeLa. Ce résultat peut être expliqué si on admet que le TPA n'induit pas le même facteur AP1 dans les deux lignées cellulaires. Dans ce cas, le facteur AP1 induit dans les cellules HeLa aurait plus d'affinité pour le site AP1-II que le facteur AP1 induit dans les cellules HepG2. Par contre, le site AP1-collagénase fixerait les deux dimères avec la même affinité. Cette hypothèse est concevable car il est bien connu que le facteur AP1 est un dimère et que chaque sous unité le composant appartient à une famille des protéines : il peut être composé par exemple des dimères cJun-cFos mais aussi des dimères cJun-cJun ou à des protéines de la famille ATF (activating transcription factor) (Steinmuller *et al*, 2001). Bien que cette hypothèse ne puisse être démontrée qu'après une analyse exhaustive des protéines composant AP1 dans les deux lignées elle est appuyée par les résultats des transfections transitoires. En effet l'activité promotrice du fragment «- 348 + 60» comprenant ce site est induite 4 fois dans les cellules HeLa et seulement 2,5 fois dans les cellules HepG2.

Afin de caractériser le facteur AP1 qui se fixe sur le site AP1-II, nous avons réalisé une expérience de «supershift» en utilisant un anticorps spécifique de cJun. Les résultats présentés dans la Figure 36 montrent que lorsque cet anticorps est inclus dans le milieu réactionnel le signal correspondant au facteur AP1 fixé sur la sonde est diminué et que simultanément une bande de

mobilité réduite est révélée. La même observation peut être faite pour les cellules HeLa et les cellules HepG2.

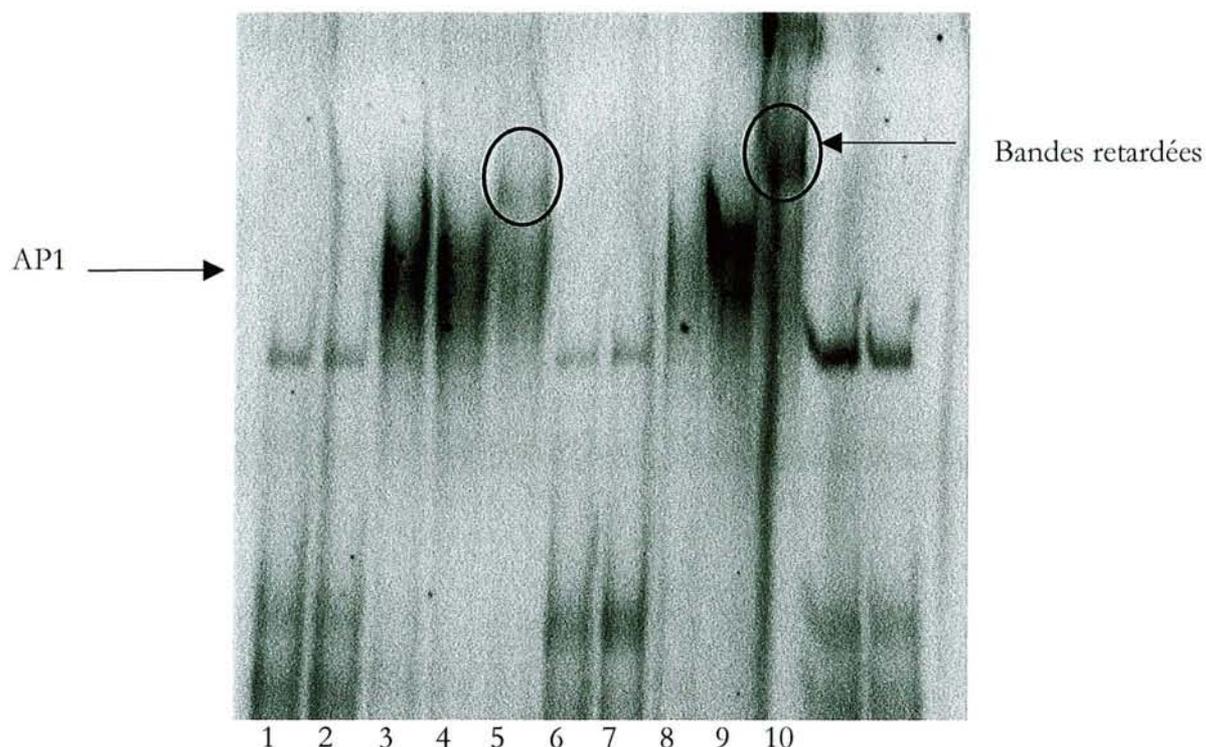


Figure 36 : Etude de la composition du facteur AP1 par supershift avec l'anticorps dirigé contre cJun. 5 μ g des extraits nucléaires des cellules HeLa (pistes 1 et 2), HeLa traitées au TPA (pistes 4, 5 et 6) HepG₂ (pistes 6 et 7) ou HepG₂ traitées au TPA (pistes 8, 9 et 10) sont incubées avec 1 ng de la sonde AP1-II (pistes 1, 3, 5, 6, 8 et 10) ou 1 ng de la sonde AP1-collagénase (pistes 2, 4, 7 et 9). Pour les expériences de supershift, les extraits nucléaires sont préalablement incubés pendant 30 minutes avec 2 μ g de l'anticorps contre cJun.

En résumé nous avons montré que le traitement au TPA induit le facteur AP1 dans les cellules HeLa et HepG₂ ; qu'au moins un des composants de ce facteur AP1 est cJun ; que ce facteur est responsable de l'induction de l'activité du promoteur B du gène de la GGT humaine ; et enfin que cette induction est due au site AP1-II de ce promoteur.

Ces résultats démontrent pour la première fois un mécanisme de régulation de l'expression de la GGT.

1.3.2. Etude fonctionnelle du promoteur C en réponse au TPA et au NaBu

Comme nous l'avons vu, l'analyse des séquences promotrices permet d'appréhender les mécanismes de régulation d'un gène, et notamment de déterminer les facteurs impliqués dans sa transcription. Après avoir étudié la régulation du promoteur B par le TPA, nous nous sommes intéressés aux fragments pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆ qui contiennent le promoteur supposé pour la transcription de l'ARNm I_C.

Nous avons montré que cet ARNm était augmenté après les traitements par le TPA et le NaBu dans les cellules HeLa. Dans les cellules HepG2, nous avons trouvé une augmentation du taux de ce messager après les traitements par le TPA et une diminution après le traitement par NaBu (Tableau VII). Nous avons donc voulu savoir si ces changements étaient corrélés avec une modulation de l'activité promotrice, démontrée par des transfections transitoires.

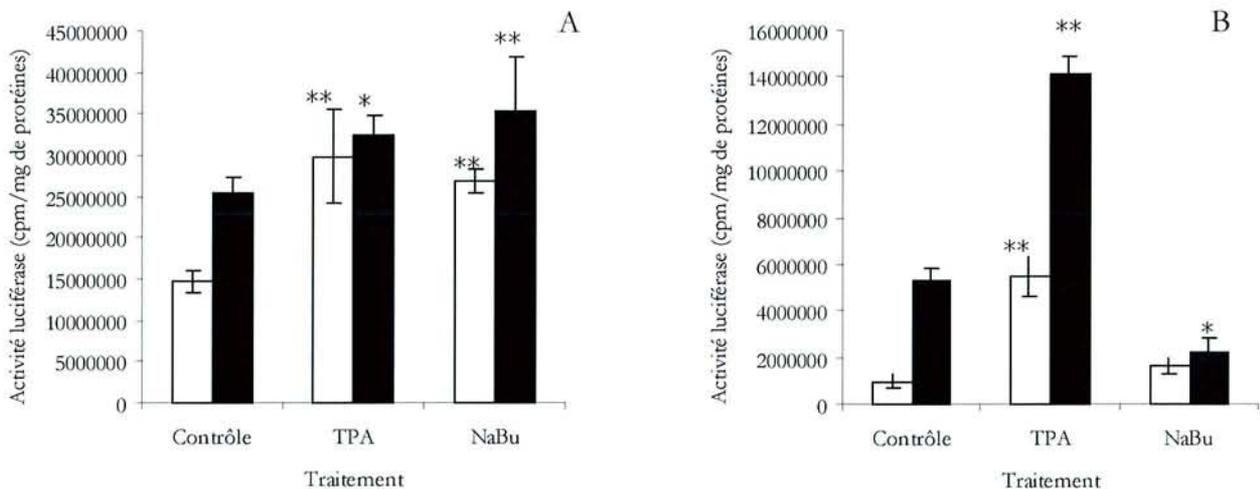


Figure 37 : Modulation des activités promotrices des fragments pGGT C₋₄₈₉ et pGGT C₋₈₅₆ dans la lignée HeLa (A) et dans la lignée HepG2 (B). Les cellules ont été transfectées par 5 µg des plasmides pGGT C₋₄₈₉ (□) ou pGGT C₋₈₅₆ (■) par le réactif superfect. 24 heures après la transfection, les cellules ont été traitées pendant 10 heures par 2 µM de TPA, 2,5 mM de NaBu. L'activité promotrice contrôle correspond à celle mesurée pour les cellules HeLa ou HepG2 non traitées. * : p < 0,01, ** : p < 0.005 par rapport à l'activité promotrice obtenue dans la lignée non traitée pour le même plasmide

Comme le montre la Figure 37, dans les cellules HeLa l'activité promotrice des 2 fragments est en effet induite après traitement au TPA et au NaBu. Cette induction est plus marquée pour le

plasmide pGGT C₋₄₈₉ indiquant que les éléments de réponse à ces traitements sont compris dans cette région du promoteur. En tout cas, ces inductions concordent avec les augmentations des ARNm correspondant indiquant une régulation au niveau transcriptionnel.

Dans les cellules HepG2, le traitement au TPA provoque une induction de l'activité promotrice bien supérieure à celle observée dans les cellules HeLa (2,6 fois contre 1,2 pour la lignée HeLa). Par contre, le traitement au NaBu inhibe l'activité promotrice du fragment pGGT C₋₈₅₆ conformément à la diminution des ARNm I_C dans cette lignée après le même traitement (Tableau VII)

En conclusion sur la régulation des activités promotrices :

- ✓ L'analyse de la séquence promotrice qui contrôle la transcription des ARNm I_B a montré l'existence de plusieurs sites potentiels pour la fixation du facteur de transcription AP1. Les expériences de transfections transitoires dans les lignées HeLa et HepG2 nous ont permis de montrer que le traitement au TPA induit l'activité promotrice quelle que soit la longueur du fragment promoteur testé.
- ✓ Cependant, il apparaît que le promoteur est régulé de façon différente en fonction de la lignée cellulaire : dans la lignée HepG2, les fragments pGGT₋₃₄₈, pGGT₋₅₆₀ et pGGT₋₇₇₈ possèdent la même activité promotrice basale, mais l'induction par le TPA est proportionnelle à la longueur du fragment.
- ✓ Par contre, dans la lignée HeLa, les fragments pGGT₋₃₄₈, pGGT₋₅₆₀ et pGGT₋₇₇₈ montrent une activité promotrice croissante (dépendante de la longueur de la séquence promotrice clonée en amont du gène de la luciférase) mais l'induction de cette activité est inversement proportionnelle à la longueur du fragment.
- ✓ Parmi les sites AP1 potentiels, nous avons voulu déterminer quels étaient ceux responsables de l'induction de l'activité promotrice par le TPA.

Nous avons alors testé la capacité des séquences AP1-I, AP1-II et ARE à fixer les facteurs de transcription par des expériences de retardement sur gel et nous avons montré que le site AP1-II est fortement sollicité lors de l'induction par le TPA alors que toutes les autres séquences testées ne semblent pas capables de fixer de facteurs protéiques.

- ✓ Ainsi, parmi les 3 sites AP1 potentiels situés à proximité du site d'initiation de la transcription, seul le site proximal AP1-II semble être impliqué dans la régulation de l'expression de la GGT. Ce site serait reconnu par un complexe AP1 composé de la sous unité cJun et induit en réponse au TPA.

Pour le promoteur C, nous avons également mis en évidence une régulation spécifique du type cellulaire et dépendante de la longueur du fragment cloné en amont de la luciférase. Les régulations des activités promotrices sont corrélées aux variations du taux d'ARNm I_C après un traitement par le NaBu ou le TPA dans les deux lignées.

- ✓ L'ensemble de ces résultats suggère que les modulations des ARNm I_C sont dues à des variations de la transcription du gène. Le fait qu'un même traitement dans deux lignées différentes à un effet opposé suggère que la régulation de ce promoteur est spécifique du type cellulaire (tout comme le promoteur B).

DISCUSSION 1^{ère} PARTIE

Il existe assez peu de données sur les mécanismes qui contrôlent l'expression de la GGT humaine car l'organisation génomique complexe de cette enzyme a freiné la compréhension de sa régulation. Chez l'homme, le gène I est le seul qui code pour une enzyme active. A partir de ce gène, 3 ARNm (ARNm I_A, ARNm I_B et ARNm I_C) sont transcrits. Ils ont le même cadre ouvert de lecture, mais ils diffèrent par leur extrémité 5' NT (Goodspeed *et al*, 1989).

La plupart des études ont été menées chez le rat ou la souris chez lesquels l'organisation des gènes et des promoteurs sont connus ce qui facilite la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu.

Chez toutes les espèces animales considérées jusqu'à présent, la GGT est codée par plusieurs ARNm dont l'origine provient d'épissage alternatifs et/ou de l'utilisation de différents promoteurs.

Dans la première partie de notre étude, nous avons tenté d'apporter des informations complémentaires sur la régulation de la GGT par différents stimuli et nous avons essayé d'apporter des explications sur les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Régulation différentielle des différents sous types :

La majeure partie des études portant sur la régulation de l'expression de la GGT emploient la technique de PCR décrite par Courtay *et al* (1994) qui utilise des amorces amplifiant ce que nous avons appelé l'ARNm total (ARNm I_T) et qui inclut (au moins) les 3 sous types d'ARNm I connus. Cependant si l'on veut approcher les mécanismes moléculaires de la régulation, il est primordial de considérer chacun des messagers de façon indépendante. Tsutsumi *et al* (1996) ont élaboré une technique de PCR suivie de Southern blots spécifiques qui permet de prendre en considération le taux relatif des 3 messagers de façon indépendante. Les amorces de PCR ont été choisies dans la région 5' NT au niveau de séquences spécifiques à chaque messenger de la GGT. Les auteurs ont alors déterminé la distribution des messagers dans différents tissus humains : le sous type A est largement exprimé dans les différents tissus examinés alors que l'ARNm I_C est détecté seulement dans l'œsophage et le rein. Il existe donc une expression tissu spécifique des ARNm I de la GGT. Dans notre laboratoire, El Yaagoubi *et al* (1998) se sont intéressés à la régulation de deux des 3 sous types par l'azacytidine (agent induisant une déméthylation de

l'ADN) dans des lignées dérivées de tumeurs de la prostate (LNCap et PC3). En réponse à ce traitement, les ARNm I_B et I_C sont induits, et cette induction est corrélée avec le niveau de méthylation du gène et avec l'activité GGT mesurée. Ainsi, la modification de la méthylation de l'ADN pourrait intervenir dans la régulation de l'expression du gène de la GGT.

Pour mener notre étude, nous avons utilisé une technique de PCR basée sur celle décrite par Tsutsumi *et al* (1996) et nous avons étudié la distribution relative des 3 messagers dans 4 lignées cellulaires différentes : la lignée HepG2 (hepatome), la lignée U937 (cellules leucémiques), la lignée LNCap (carcinome prostatique) et la lignée HeLa (cancer de l'endomètre). Ces lignées exhibent des niveaux d'activité GGT différents (Tableau VI).

L'analyse de la distribution des messagers a révélé que toutes les lignées étudiées expriment les 3 sous types. Cependant, leurs taux relatifs varient en fonction de la lignée cellulaire considérée : pour les cellules HepG2, le sous type B est largement majoritaire, ce qui est en accord avec les résultats publiés pour cette lignée (Tsutsumi *et al*, 1996). Dans les cellules HeLa et LNCap, c'est l'ARNm I_A qui constitue la population majoritaire alors que dans la lignée U937, les ARNm I_A et I_C sont largement majoritaires par rapport à l'ARNm I_B qui est très peu représenté (Tableau VII). Dans les tissus humains, la présence simultanée des 3 sous types n'a jamais été rapportée. Il est probable que dans les lignées cellulaires étudiées l'expression de la GGT soit altérée et qu'elle ne reflète pas l'expression tissulaire, ou plus simplement, notre technique de détection est peut être plus sensible et elle permet de détecter de faibles quantités de chaque population de messagers. Chez le rat, les ARNm transcrits du gène de la GGT sont au nombre de 7 et possèdent eux aussi une expression tissu spécifique : les ARNm III (transcrits à partir du promoteur III) sont exprimés dans tous les tissus alors que les autres espèces de messagers présentent une spécificité tissulaire pour leur expression. Au sein d'un même tissu, la répartition des populations de messagers varie en fonction du type cellulaire. Dans l'épididyme de rat, les ARNm II, III et IV sont exprimés et régulé par la testostérone et les facteurs testiculaires de façon région spécifique (Palladino *et al*, 1994).

Nous avons également suivi les modulations d'expression des ARNm I_A , I_B , et I_C dans les 4 lignées cellulaires en réponse à des traitements par le $TNF\alpha$, le TPA et le NaBu. Les résultats

obtenus ont permis de démontrer que chaque ARNm est régulé de façon indépendante et que leurs modulations sont différentes en fonction de la lignée cellulaire. Par exemple, en réponse à un traitement au TPA, le sous type B est induit dans les cellules U937 et le sous type A reste inchangé alors que le contraire est observé dans la lignée cellulaire HepG2. Le traitement au NaBu induit le sous type C dans les cellules HeLa, mais diminue le taux d'expression du même messager dans les lignées HepG2 et LNCap.

Il ressort cependant de ces données que les modulations globales des 3 sous types sont corrélées à la variation du taux d'ARNm I_T (Figure 21), ainsi qu'à l'activité GGT mesurée. La mesure du taux de l'ARNm I_T reflète bien le degré d'expression de l'enzyme puisque ces deux paramètres sont toujours corrélés et l'on, peut supposer que la régulation de l'expression de l'enzyme a lieu au niveau des ARNm correspondant, soit par le contrôle de la transcription, soit par la modification de la $\frac{1}{2}$ vie un ou plusieurs des ARNm. Les variations d'activité GGT en réponse à un traitement sont donc la conséquence de la régulation de chacun des 3 sous types de messagers

Comment expliquer les mécanismes impliqués ?

Dans notre étude, les mécanismes mis en causes dans les différentes modulations sont difficiles à élucider car le $TNF\alpha$, le NaBu et le TPA peuvent avoir des effets pleiotropiques. En effet, le $TNF\alpha$ peut induire certains gènes par différentes voies : il conduit par exemple à l'induction de la γ GCS en activant la transcription du gène de la sous unité lourde probablement via un site AP1 (Morales *et al*, 1997). Il a été également démontré que le $TNF\alpha$ peut intervenir sur la régulation de la protéine WAF1 (cyclin-dependent kinase inhibitor) sans agir sur la transcription. Shiohara *et al*, (1996) ont démontré que cette induction passe par une stabilisation du messenger correspondant dont la $\frac{1}{2}$ vie est multipliée par 5. Or, nous avons montré que le traitement par le $TNF\alpha$ résulte en une diminution du taux des 3 messagers dans la lignée LNCap. L'inhibition de l'expression de gène par le $TNF\alpha$ à déjà été rapportée : dans la lignée HeLa, cet agent entraîne la diminution du taux de l'ARNm correspondant au gène *c-myc* via une inhibition de la transcription (Yarden *et al*, 1986).

Le NaBu peut lui aussi agir sur l'expression des gènes par des mécanismes variés. Ainsi, dans les cellules HepG2, il induit l'expression de la phosphatase alcaline via une activation de la transcription (Khan *et al*, 1999), mais il inhibe l'expression du gène de la cholesterol acyl

transferase par un mécanisme post transcriptionnel impliquant la dégradation de l'ARNm pré-messagers correspondant (Skretting *et al*, 1997).

Certains des mécanismes de régulation de la GGT ont été élucidés, notamment chez le rat. La diversité de ces mécanismes laisse présager de la complexité de la régulation du gène humain.

- La spécificité tissulaire de distribution et de régulation des différents messagers provient (entre autres) de l'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre des promoteurs. Par exemple, durant la différenciation les cellules hépatoblastiques expriment les ARNm transcrits à partir des promoteurs P3, P4 et P5. Lorsque ces cellules se différencient vers la voie biliaire, les promoteurs P3 et P5 ne sont plus utilisés et lorsqu'elles se différencient vers la voie hépatique, ce sont les promoteurs P4 et P5 ne sont plus utilisés (Holic *et al*, 2000).

- Le statut de méthylation du gène est également un facteur déterminant pour la régulation de l'expression des messagers de la GGT de rat. Baik *et al* (1992a) ont montré que des traitements répétés des cellules Fao par la 5-azacytidine induisaient une forte augmentation de l'activité GGT. Plus précisément, seul l'ARNm III présent dans cette lignée cellulaire est surexprimé après le traitement par la 5-azacytidine qui induit une hypométhylation du gène ce qui indique que la déméthylation a lieu plus spécifiquement au niveau du promoteur P3. La même équipe s'est alors intéressée à la méthylation des promoteurs P1 et P2 dans le rein de rats adultes, nouveau-nés ou fœtaux. Au cours du développement, ces deux promoteurs sont progressivement activés et cette activation est corrélée avec la déméthylation progressive dans les régions du promoteur P1 et P2 (Baik *et al*, 1992 b).

- Rudolph et Hinton (1997), se sont intéressés aux mécanismes impliqués dans la diminution du taux de l'ARNm IV dans l'épididyme de rat lors de la privation de facteurs testiculaires. La stabilité de l'ARNm correspondant n'est pas affectée, mais le taux de transcription est diminué d'environ 70 %.

- L'étude des séquences promotrices en amont des sites d'initiation de la transcription peut aussi apporter des informations importantes pour la connaissance des facteurs protéiques impliqués dans la régulation des différents messagers. Par exemple, la régulation de l'ARNm IV dans l'épididyme de rat par les facteurs testiculaires pourrait être liée à la séquence consensus 5'-AGGAAG-3' située dans la région promotrice P4. En effet, cette séquence est reconnue par le facteur PEA 3 (polyomavirus enhancer activator) qui est présent dans le fragment initial de

l'épididyme à un taux supérieur à celui trouvé dans le fragment distal (où l'ARNm IV est d'ailleurs exprimé de façon moins importante). De plus, la quantification de l'ARNm correspondant à la protéine PEA 3 ont montré que ce facteur est régulé par les hormones testiculaires (Lan *et al*, 1997).

- Plusieurs sites consensus pour AP1, AP2 et un ARE sont localisés dans les séquences proximales des promoteurs de la GGT de rat. La plupart d'entre eux, conservés chez la souris seraient responsables des modifications d'expression de la GGT en réponse à un stress oxydant. Par exemple, dans l'épididyme de rat, deux autres ARNm (II et IV) sont induits par des stimuli oxydatifs (ERO) d'environ 70 % (Markey *et al*, 1998).

Ainsi, les 1^{er} résultats de notre étude sur la régulation de l'expression de la GGT dans 4 lignées cellulaires humaines n'apportent pas d'explications sur les mécanismes moléculaires mis en jeu, mais peuvent servir de base à la réflexion et aux stratégies à adopter. Nous retiendrons par exemple que, pour être correctes les études doivent considérer les 3 sous types de messagers de façon indépendante. Il est d'ailleurs fort probable que chaque messenger dépende d'un promoteur indépendant comme c'est le cas chez le rat et la souris.

Etudes de la régulation du promoteur B par le TPA :

La séquence du promoteur dirigeant la transcription des ARNm I_B récemment publiée constitue un outil pour l'étude des sites impliqués dans la régulation de cet ARNm. L'analyse de cette séquence montre qu'il y a plusieurs sites potentiels pour la fixation de AP1 et un site potentiel ARE (ne diffèrent que d'une base du site consensus) en amont du site d'initiation de la transcription. Nous avons alors décidé d'explorer les différents sites potentiels pour AP1 afin de savoir s'ils sont impliqués dans la modulation de l'expression de l'ARNm I_B par le TPA dans deux lignées cellulaires différentes.

Pour se faire, nous avons transfecté les cellules HeLa et HepG2 par des plasmides contenant différents fragments de la région promotrice en amont du gène de la luciférase :

pGGT B₃₄₈ contient le cluster AP1-I, ARE et AP1-II.

pGGT B₅₆₀ contient les 3 sites précédents et le site AP1-III

pGGT B₇₈₄ contient les sites AP1-I, AP1-II, AP1-III, ARE et AP1-IV.

Dans les cellules HeLa non traitées, l'activité promotrice mesurée est proportionnelle à la longueur du fragment cloné en amont du gène de la luciférase (figure 33 B) ce qui indique que les séquences situées en amont du cluster AP1 sont importantes pour cette activité promotrice. Par contre, l'inductibilité par le TPA est la plus importante pour le fragment le plus court (6 fois pour le plasmide pGGT B₃₄₈) ; l'ajout de séquences, résulte en une diminution de l'induction par le TPA indiquant qu'en amont des 3 premiers sites AP1 doivent se trouver d'autres sites de régulation qui interfèrent avec ceux-ci.

Dans les cellules HepG2 non traitées, tous les fragments possèdent la même activité promotrice, comme si dans cette lignée, la présence des séquences comprises entre - 348 et + 60 pb étaient suffisantes pour l'initiation de la transcription. Cependant, les mécanismes d'induction par le TPA sont différents de ceux incriminés dans la lignée HeLa puisque dans les cellules HepG2 l'ajout de séquences en amont des 3 premiers sites AP1 potentialise l'induction par le TPA (figure 33 A).

Il semble donc que la spécificité cellulaire de régulation du taux d'ARNm I_B soit lié à la spécificité cellulaire de régulation du promoteur B.

Rôle des séquences promotrices dans la spécificité tissulaire d'expression des messagers :

Le facteur AP1 est impliqué dans la régulation tissu spécifique de certains gènes comme le gène humain de la « profilagrine » (gène exprimé dans les couches granulaires de l'épiderme en fin de différenciation). La présence du motif AP1 à la position - 77 liant le complexe cJun/cFos est primordiale pour la transcription de ce gène dans des cellules épidermiques (Jang *et al*, 1996) alors que le même fragment promoteur n'a qu'une très faible activité dans les cellules HeLa.

Fabbro *et al*, 1999 ont étudié le rôle des séquences promotrices du gène $\alpha 1$ (VI) collagène dans la régulation tissulaire de son expression. Ils ont montré que dans les cellules NIH3T3 (fibroblastes) qui expriment très fortement le gène, un site AP1 fixe le facteur constitué de la sous unité Jun D et est responsable de la transactivation du gène. Dans la lignée cellulaire EL4 (cellules T n'exprimant pas le gène) le même site fixe un facteur de composition différente et cette fixation n'est pas déplacée par la sonde consensus AP1. Ces résultats démontrent qu'une même séquence peut fixer des facteurs protéiques de nature différente selon la lignée cellulaire considérée. Cela pourrait être en cause dans la régulation tissu spécifique de certains gènes.

Il se peut que la spécificité tissulaire provienne de la fixation de facteurs protéiques particuliers à la lignée considérée sur les séquences en amont de la position - 348. Par exemple, le facteur de transcription YY1 est un facteur multifonctionnel qui peut inhiber ou activer la transcription de nombreux gènes. O'Connor *et al*, (1996) ont démontré que ce facteur pouvait inhiber la transcription de l'oncogène HPV-16 (human papilloma virus type 16) E6 probablement en interagissant avec la protéine CBP (CREB binding protein) et en inhibant l'activité de AP1. La séquence consensus reconnue par YY1 est 5'-CCATNTT-3' que nous retrouvons dans la séquence promotrice à la position - 685 à - 678 (dans le fragment pGGT B₇₈₄). (p.123)

L'étude de l'activité promotrice de la région 5' du gène de l'INF τ (interferon tau) de mouton à montré que cette région possède une forte activité dans les cellules JEG3 (chorio-carcinome humain), et une activité plus faible dans la lignée cellulaire HeLa. De même, il y a une forte induction par le TPA dans la lignée JEG3 alors que l'activité promotrice dans les cellules HeLa reste inchangée. Des expériences de délétions ont montré qu'un élément « enhancer » à la position - 654 à - 555 est nécessaire à la forte activité promotrice et à l'induction par le TPA dans les cellules JEG3 alors que cette région ne semble jouer aucun rôle dans la lignée HeLa. Les analyses par retardement sur gel des complexes fixés par les régions enhancer montre qu'une de ces séquences (GATA like) fixe des facteurs protéiques de nature différente selon la lignée considérée et serait sans doute responsable de la spécificité cellulaire pour la régulation du gène de l'INF τ (Yamaguchi *et al*, 2001).

Dans notre cas, une étude plus approfondie des séquences en amont du site +1 et des facteurs de transcription qui s'y fixent serait nécessaire pour expliquer les différences activités promotrices observées entre la lignée HeLa et HepG2. Par exemple, il y a un site CRE qui pourrait également intervenir dans la modulation de l'activité du promoteur par les voies d'activation de la protéine kinase A qui conduisent à la phosphorylation et à l'activation de la protéine CBP.

Etude du rôle des différents sites AP1 du promoteur B dans la réponse au TPA :

Dans les 2 lignées cellulaires étudiées, le traitement par le TPA induit l'activité promotrice du plus petit fragment pGGT B₃₄₈ qui contient 3 sites potentiels rapprochés pour le facteur AP1. Nous avons voulu étudier plus spécifiquement le rôle de chacun de ces sites potentiels dans l'activation de la transcription. Nous avons donc travaillé sur les facteurs nucléaires extraits des cellules HeLa et HepG2 traitées ou non au TPA, et nous avons testé leur capacité à se fixer aux séquences AP1-I, ARE et AP1-II par des expériences de retardement sur gel.

Dans les deux lignées cellulaires, un seul site potentiel peut fixer le facteur AP1 : le site AP1-II (le plus en amont), les deux autres sites ne fixant aucun facteur de transcription. Nous avons également montré que le facteur AP1 fixé au site AP1-II est fortement induit par le traitement au TPA et qu'il est constitué de la sous unité cJun au moins. Etant donné que la sonde contrôle AP1-collagénase déplace totalement le signal, quand elle est ajoutée en excès aux incubations, il se peut que les deux oligonucléotides AP1-II et AP1-collagénase fixent le même facteur (cJun/cFos). Cependant, si l'on regarde les résultats de retardement sur gel (figure 35), on s'aperçoit que le traitement au TPA induit une fixation beaucoup plus importante de AP1 au site AP1-II dans la lignée HeLa. Cela peut s'expliquer si deux facteurs AP1 de compositions différentes sont induits par le TPA en fonction de la lignée cellulaire considérée. D'ailleurs, cette fixation moindre d'un facteur au site consensus AP1-II est corrélée avec l'induction moins forte de l'activité promotrice du fragment pGGT B₃₄₈ dans la lignée HepG2 (2,5 fois contre 4 fois dans la lignée HeLa).

Il est surprenant de constater que des séquences relativement proches (comme AP1-I et AP1-II) ne fixent pas de la même façon les facteurs de transcription. Dans un travail récent, Bianchi *et al* (2002) ont étudié le rôle d'une région contenant 3 sites AP1 organisés en cluster (à proximité les uns des autres à la position - 1599 à - 1654) dans la régulation de la transcription du gène de l'ornithine decarboxylase de souris en réponse à l'HGF (hepatocyte growth factor). Les auteurs ont démontré que le cluster complet est nécessaire à l'activation de ce gène bien que la séquence AP1 la plus proche du + 1 ne fixe aucun facteur de transcription.

Ainsi, pour la 1^{ère} fois, nous sommes capables de proposer un mécanisme de régulation de l'expression de la GGT qui impliquerait une activation via AP1 du promoteur B.

Clonage et caractérisation du promoteur C :

A partir des résultats obtenus dans la première partie de l'étude et sachant que la régulation de l'expression des ARNm de la GGT de souris et de rat est basée sur l'utilisation spécifique des différents promoteurs, nous avons supposé que le gène I de la GGT devait lui aussi posséder d'autres promoteurs pour la régulation de la transcription. Nous avons alors décidé de localiser et de caractériser le promoteur C (responsable de la transcription des ARNm I_C).

Les expériences de 5' RACE nous ont permis de situer le +1 potentiel immédiatement en amont de l'exon VII. Or les séquences précédant ce +1 ne contiennent pas de «TATA box», ni d'élément initiateur. Seuls quelques sites potentiels de fixation pour les facteurs SP1, AP1, AP2, un site XRE et une BARBIE box (élément de réponse aux barbituriques) sont présents dans cette région proximale. Si l'on compare l'organisation de cette région avec celle du promoteur B, il ressort cependant quelques points communs :

Les deux régions promotrices identifiées ne sont pas des promoteurs à « TATA box »

Dans les deux séquences promotrices un cluster de 3 sites potentiels pour AP1 est présent, en position - 240 à - 192 pour le promoteur B et en position -540 – 492 pour le promoteur C (soit pour les deux dans un intervalle de 42 pb).

Le site potentiel central ne diffère que d'une base du site ARE consensus dans les deux promoteurs.

Pour les deux promoteurs, le site consensus le plus proche du +1 identifié est un site de reconnaissance pour le facteur SP1 qui joue un rôle central dans l'initiation et la régulation de la transcription de différents gènes (Nishitani *et al*, 1995 ; Portugal *et al*, 2001)

Si l'on compare maintenant le promoteur C aux promoteurs de la GGT de rat ou de souris il en ressort que :

- Les exons présentant de fortes homologies avec l'exon VII humain, c'est à dire l'exon III pour le gène de la GGT de rat et l'exon IV pour celui de la souris sont des exons leader, précédés du promoteur P3 pour le rat et du promoteur PIV pour la souris.
- Ces promoteurs sont responsables d'une forte expression du gène de la GGT chez ces deux espèces puisque le P3 de rat à une expression ubiquitaire et les ARNm IV de souris se retrouvent dans beaucoup de tissus.

Hudson *et al*, (1997) ont caractérisé les éléments qui régulent la transcription de l'ARNm III de rat par des expériences de «foot printing» et de retardement sur gel. Ce promoteur ne contient pas de «TATA box», mais que les éléments situés en position - 185 à + 55 sont responsables de l'activité de base de ce promoteur. Cette région contient notamment une «CAAT' box» à la position - 127 à - 102 que nous ne retrouvons pas dans notre séquence promotrice. Par contre, il y a un site de fixation pour le complexe TFIID à la position - 33 à - 8 (site TFIID-binding). Ce site diffère du site consensus, et cette différence conduit à une moins bonne fixation du TFIID purifié. En amont de ce site se trouve une boîte «GAGA» (région riche en GA). Quand les expériences de retardement sur gel sont effectuées avec l'oligonucléotide marqué contenant cette région GAGA et le site TFIID, la fixation de ce facteur devient beaucoup plus efficace et les auteurs suggèrent que la liaison du facteur TFIID simultanément aux sites «GAGA» et TFIID-binding résulte en la formation d'une structure qui pourrait être impliquée dans la fixation du complexe d'initiation de la transcription (Griffith *et al*, 1995).

Or, si l'on observe les séquences - 67 à - 36 sur notre promoteur C, nous constatons la présence de ces mêmes régions, c'est à dire une «GAGA box» suivie d'un site de fixation pour TFIID.

Les séquences de ces différents sites sont présentés dans le tableau IX :

Ce site est très important dans le promoteur P3 de rat puisqu'il est capable d'induire la transcription 8 pb plus loin. Il est donc fort probable que cette séquence ait la même fonction dans le promoteur C du gène humain.

Tableau IX : Séquences des sites «TFII D binding» des promoteurs C humain et P3 de rat

Séquence		position
TF II D consensus	GCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGA	
TF II D P3 rat	AGGAGCTGGGTCACTGCTGGGGATG	- 33 à - 8
TF II D PC humain	AGGAGCTGGGTCA <u>CAGCAGGG</u> A <u>T</u> C	- 61 à - 36
GAGA box P3 rat	AGGGGAGGGAAGG	- 47 à -34
GAGA box P3 humain	AGGGGAGGGAAGG	- 74 à - 97

Les bases différentes sont indiquées en italique souligné.

Des « GAGA box » sont observées dans les promoteurs de certains gènes ne possédant pas de TATA box comme le gène humain du collagène $\alpha 1(V)$ (Lee *et al*, 1995). La délétion de cette séquence dans le gène humain MSX-1 entraîne une perte totale de l'activité du promoteur (Shen *et al*, 1994). Il est également intéressant de constater que ces séquences sont également présentes dans des promoteurs plus classiques (à TATA box) comme celui de la sous unité lourde de la γ GCS de rat (Meister *et al*, 1989).

Les 100 premiers nucléotides de la région en amont du +1 de l'ARNm III de rat s'alignent avec ceux du promoteur PIV de la souris avec une homologie de plus de 86 %, ces deux promoteurs sont «TATA less» et utilisent le site TFIID-binding pour l'initiation de la transcription (Brouillet *et al*, 1994). Cependant, il est fort probable que le site d'initiation de la transcription déterminé pour l'ARNm I_C ne soit pas le seul. Par exemple, la transcription de l'ARNm de type IV peut avoir lieu au niveau du +1 (site majoritaire) au niveau du +11 (site minoritaire). Nos expériences de 5'RACE ne nous ont permis d'isoler qu'une seule population de messagers mais nous n'avions que deux clones. Il serait nécessaire de déterminer le +1 avec précision par des expériences de protection à la RNase par exemple afin de pouvoir aligner et comparer correctement les régions promotrices du gène des différentes espèces.

Les fragments pGGT C_{.489} et pGGT C_{.856} issus de la région en amont de l'exon VII de l'ARNm I_C possèdent une forte activité promotrice dans les lignées HeLa et HepG2, lignées dans lesquelles l'ARNm I_C est d'ailleurs présent en quantité relativement importante. Les résultats de

ces transfections sont importants car ils confirment que la séquence clonée à partir du gène I de la GGT humaine contient un promoteur.

Nous avons aussi étudié la régulation de ce promoteur par deux des agents utilisés dans la première partie du travail : le TPA et le NaBu. Dans la lignée HeLa, l'ARNm I_C est induit suite à ces deux traitements et dans la lignée HepG2, l'ARNm I_C est induit par le traitement au TPA, mais il est diminué suite au traitement par le NaBu (Tableau VII).

Pour la lignée, HeLa, le traitement au TPA induit l'activité promotrice des deux fragments pGGT C_{-489} et pGGT C_{-856} . Le NaBu est également responsable d'une induction de l'activité promotrice. Ces résultats sont corrélés avec l'augmentation du taux d'ARNm I_C observée suite à ces traitements dans les cellules HeLa.

Pour la lignée HepG2, les résultats de la transfection sont également corrélés aux variations du taux de l'ARNm I_C observées après le traitement de ces cellules par le NaBu.

Comme dans la lignée HeLa, l'activité promotrice des deux fragments est augmentée après le traitement au TPA. Ces résultats indiquent que les séquences comprises entre - 489 et + 71 contiennent des éléments de réponse au TPA.

Le traitement par le NaBu ne modifie pas l'activité promotrice du fragment pGGT C_{-489} dans les cellules HepG2 alors qu'il l'active dans la lignée HeLa. Le même traitement inhibe l'activité promotrice du fragment pGGT C_{-856} dans la lignée HepG2, indiquant que les séquences comprises entre - 856 et - 489 contiennent des éléments de réponse à ce stimulus. En accord avec ces résultats, nous avons également montré que le taux d'ARNm I_C est diminué 2 fois en réponse au traitement par le NaBu des cellules HepG2.

Ainsi, la spécificité cellulaire de régulation du taux de l'ARNm I_C serait probablement liée à la régulation spécifique de l'activité du promoteur C.

ARTICLE 1

« Differential regulation of gamma-glutamyltransferase mRNAs in four human tumour cell lines ». *Biochim Biophys Acta.*(2001), 568: 67-73.

Daubeuf S, Accaoui MJ, Pettersen I, Huseby NE, Visvikis A, Galteau MM.

Differential regulation of γ -glutamyltransferase mRNAs in four human tumour cell lines

S. Daubeuf^a, M.J. Accaoui^a, I. Pettersen^b, N.E. Huseby^b, A. Visvikis^{a,*},
M.M. Galteau^a

^a *Thiols et Fonctions Cellulaires, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy 1, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France*

^b *Department of Medical Biology, University of Tromsø, Tromsø, Norway*

Received 12 June 2001; received in revised form 13 August 2001; accepted 13 August 2001

Abstract

Human γ -glutamyltransferase (GGT) belongs to a multigenic family and at least three mRNAs are transcribed from the gene that codes for an active enzyme. Four human tumour cell lines (HepG2, LNCap, HeLa and U937) with different GGT levels were used to investigate how GGT activity, total GGT mRNA and each individual GGT mRNA subtype responded to tumour necrosis factor- α (TNF- α), 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) or sodium butyrate treatment. Butyrate reduced the GGT activity in HepG2 cells, and the level of total GGT mRNA accordingly, whereas TNF- α and TPA did not alter these parameters. In LNCap cells, TNF- α , TPA, and butyrate reduced the activity as well as the level of GGT total mRNA. In HeLa cells no significant changes were observed either in activity or in mRNA level whereas TPA induced both GGT activity and mRNA levels in U937 cells. The distribution of each GGT mRNA subtype (A, B and C) was found to be cell specific: type B mRNA was the major form in HepG2 cells, while type A was the major form in LNCap and HeLa, type A and type C were expressed almost at the same level in U937 cells. The GGT mRNA subtypes were also differently modulated in these cells after TNF- α , TPA or butyrate treatment, suggesting that they are regulated by distinct and cell type specific mechanisms. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: γ -Glutamyltransferase; Regulation; Human tumor cell line

1. Introduction

γ -Glutamyltransferase (GGT, EC 2.3.2.2), a glycosylated membrane enzyme, catalyses the transfer of γ -glutamyl groups from peptide donors such as glutathione to a variety of acceptors including dipeptides, free amino acids or water [1]. GGT activity is modulated in many physiological and pathological conditions, including differentiation and carcinogenesis. The GGT activity has been reported to be increased during kidney development and differentiation, but reduced in adult liver compared to fetal liver [2]. An increased GGT activity has also been detected in several neoplastic cells and notably in chemically induced tumours in rat liver [3], and in human ovary [4], prostate

[5] and lung carcinomas [6]. GGT activity has been found increased in various tumour cell lines after anticancer drug treatment. This may be of some importance in drug resistance [7–9]. More recent data suggest that GGT could play an important role in maintaining cell proliferation [10]. This role was attributed to the oxidant stress generated from the GGT dependent glutathione metabolism. On the other hand, this oxidative stress can induce lipid peroxidation [11], protein oxidation [12], and could trigger the activation of transcription factors [13].

In humans, GGT is a multigene family of at least seven genes and pseudogenes [14]. Among these human GGT genes, one locus is of great importance since its transcription generates type I GGT mRNAs [14,15], encoding an enzyme with catalytic properties that are identical to the enzyme isolated from human tissues [16]. Three subtypes of GGT mRNAs related to the type I and showing the same open reading frame (ORF) but differing in their 5' untranslated region (UTR) have been isolated from HepG2 hepatoma [17], fetal liver [18,19], and placenta [20]. For the sake of clarity we used the nomenclature

Abbreviations: GGT, γ -glutamyltransferase; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate; ORF, open reading frame; UTR, untranslated region; HCC, hepatocellular carcinoma

* Corresponding author. Fax: +33-3-83-17-88-03.

E-mail address: visvikis@pharma.u-nancy.fr (A. Visvikis).

proposed by Tsutsumi et al. [21]: subtype A corresponds to the mRNA firstly described in fetal liver, subtype B to the mRNA isolated from the human hepatoma cell line HepG2 and subtype C to the mRNA isolated from human placenta.

Diederich et al. [22] suggested that the 5' UTRs of these GGT mRNAs play an important role in the regulation of translation. Analysis of the corresponding genomic sequences showed that these mRNAs are transcribed from the same gene. However, it is not clear if they are under the control of separate promoters as in rat and mouse [23], or if the observed polymorphism is due to differential splicing events.

Little information exists concerning the regulation of the expression of these GGT mRNAs. In their study, Tsutsumi et al. [21] analysed the distribution of GGT mRNAs in healthy and cancerous tissues and suggested that subtype B is closely related to the development of human hepatocellular carcinoma (HCC). The same authors demonstrated that analysis of GGT mRNA expression may provide a useful tool for the diagnosis of HCC at its early stages.

In this report we examined the modulation of the human GGT mRNAs type I by tumour necrosis factor- α (TNF- α), 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) and sodium butyrate in four human cell lines derived from different cancer tissues: HepG2, U937, LNCap and HeLa cells. We present evidence for the first time that these mRNAs are independently regulated and that their regulation is cell type specific.

2. Material and methods

2.1. Cell lines, culture conditions and treatments

HepG2, U937, LNCap and HeLa cells, obtained from ECCAC, were grown in RPMI 1640 medium (Sigma, France) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum (Boehringer), 1% (v/v) antibiotic-antimitotic solution (Sigma) and 2 mM glutamine (Sigma).

Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂.

Cells were treated with 200 U/ml TNF- α , 2.5 mM sodium butyrate, or 2 μ M TPA (Sigma) in complete culture medium for 24 h before total RNA extraction, and for 48 h before GGT activity measurements.

2.2. Reverse transcription and polymerase chain reactions (RT-PCR)

Total RNA was extracted from untreated and treated cells using the Insta Pure reagent (Euro Gentec, Belgium) according to the manufacturer's recommendations. RNA samples were stored at -80°C until use. 4 μ g of total

RNA were used for reverse transcription using 200 U M-MLV reverse transcriptase (Promega, France) and 0.5 μ g oligo(dT)_{16–18} in 50 μ l containing 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT and 1 mM of each dNTP according to the manufacturer's recommendations.

GGT total mRNA was amplified using primers Amp1 (sense primer 5'-AATGGACGACTTCAGCTCTCC-3') and Amp2 (antisense primer 5'-AGCCGAACCAGAG-GTTGTAGA-3') [14]. β_2 -Microglobulin sequences were amplified with sense primer: 5'-ACCCCACTGAAAA-GATGA-3' and antisense primer: 5'-ATCTTCAAA-CCTCCATGATG-3'. Analysis of GGT subtype A, B, and C mRNAs expression was performed using fetal liver (subtype A) primers: (sense: 5'-CACAGGGGACATA-CAGTGAG-3', antisense: 5'-GAAATAGCTGAAGCA-CGCGC-3'), HepG2 (subtype B) primers: (sense: 5'-GGATTCTCCCAGAGATTGCC-3', antisense: 5'-GAA-GGTCAAGGGAGGTTACC-3'), and placenta (subtype C) primers (sense: 5'-GCCCAGAAGTGAGAGCAGTT-3', antisense: 5'-TCCAGAAAGCAGCTAGAGGG-5'). For PCR, a common cycling protocol was used for all sets of primers: after an initial denaturation for 2 min at 94°C, samples were submitted to 26 (Amp1/Amp2 and β_2 -microglobulin primers) or 30 cycles (primers for A, B and C subtypes of GGT mRNA I), except for HeLa and U937 cells where 35 cycles were used to amplify subtype B mRNA, with the following steps: 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, 72°C for 45 s. The Amp1/Amp2 and β_2 -microglobulin primers amplified respectively a 217 bp and 120 bp cDNA fragment. The HepG2, fetal liver and placenta primers produced PCR fragments of respectively 300 bp, 308 bp, and 386 bp.

2.3. Analysis of RT-PCR products

Amp1/Amp2 and β_2 -microglobulin RT-PCR products were quantified after agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, with a Kodak DC120 digital camera and 1D software (Kodak).

PCR products from the amplifications specific for subtype A, subtype B and subtype C GGT mRNA were transferred to a Hybond-N membrane. Hybridisation was carried out using specific biotinylated probes for subtype A (5'-GGGCAGGGCTTGGTGAATGGTAGCTG-TGATTATCATCATG-3'), subtype B (5'-CGCAGGAT-GGTGTGCGAGGACCCGAGCTGGTGTTCAGGC-3'), and subtype C (5'-ATAGAGACACCGATTCCCTG-GAGGTCCAAAGAGCCTCAGGA-3') mRNAs as described [21]. The hybridised bands were reacted with streptavidin and biotinylated alkaline phosphatase complex using the New England Biolabs (USA) Phototop detection kit according to the instruction manual, and visualised on Kodak XAR-5 film. Exposed X-ray films were quantified as above.

2.4. Measurement of GGT activity

GGT activity was determined using L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide as donor substrate and glycylglycine as acceptor substrate as previously described [24] and was expressed as mU/mg protein (corresponding to nmol of 5-nitrobenzoate/min/mg protein). Protein concentration was determined in each sample according to Lowry et al. [25] using bovine serum albumin as standard.

2.5. Statistical analysis

All assays were set up in triplicate, and the results were expressed as the mean and standard deviation (mean \pm S.D.). Student's paired *t*-test was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Modulation of GGT activity after TNF- α , TPA and sodium butyrate treatment

The human cell lines HepG2, LNCaP, HeLa and U937 showed different basal activities, ranging from 16 mU/mg protein (HeLa cells) to 144 mU/mg (HepG2 cells). The regulation of GGT was studied in these cell lines after 48 h treatment with TNF- α , TPA or sodium butyrate. As shown in Table 1, GGT activity was largely decreased in HepG2 cells after sodium butyrate treatment (-50%), while TNF- α and TPA had no significant effects. In LNCaP cells, the activity was dramatically decreased ($\sim 70\%$) after TNF- α treatment and to a lesser extent ($\sim 30\%$) after either TPA or butyrate treatment. No significant modulations in GGT activity were found after the same treatments in HeLa cells and only TPA induced the GGT activity in U937 cells by 2-fold.

3.2. Quantification of total GGT mRNA

To ascertain whether the changes in GGT activity after the various treatments were due to pretranslational control mechanisms, we measured total GGT mRNA by RT-PCR in the above four cell lines. Amplification with the GGT primers Amp1 and Amp2 is not specific for one particular

GGT mRNA subtype as the amplified sequence is located within the coding region of the GGT mRNAs [14]. Thus, the obtained signal reflects the total amount of GGT mRNA. The level of β_2 -microglobulin mRNA was used as an internal control. The β_2 -microglobulin signal did not significantly vary after the different treatments, as the maximal variation was 17% (between control and TPA treated HepG2 cells, not shown). Thus β_2 -microglobulin signal can be used under these conditions to normalise for reverse transcription and PCR efficiencies between the various samples within the same cell line.

Twenty-four hour TNF- α or TPA treatment had no effect on GGT total mRNA I in HepG2 cells but decreased it in LNCaP cells (-80% and -58% respectively, Fig. 1A,B). Butyrate treatment significantly decreased this mRNA in both cell lines (Fig. 1A,B). No significant changes were observed after the same treatments in HeLa cells (Fig. 1C). In U937 cells, while TNF- α and butyrate had no effect on the GGT total mRNA level, TPA induced a significant increase (Fig. 1D). Thus GGT total mRNA and GGT activity levels are correlated in these cell lines, suggesting a control of GGT expression at the mRNA level where a modulation of its activity was observed.

3.3. Distribution and modulation of subtype A, subtype B and subtype C GGT mRNAs

Human GGT type I mRNAs show a polymorphism in their 5' UTR and type specific PCR amplifications have been developed for the detection of these mRNAs [21]. Therefore, we employed these techniques to study the modulation of each particular type of GGT mRNA after treatment of the cell lines with TNF- α , TPA or sodium butyrate.

A representative result of the detection and quantification of the three GGT mRNA subtypes in the four cell lines is shown in Fig. 2. Bands of 300 bp (subtype A), 308 bp (subtype B) and 386 bp (subtype C) match the theoretical size of the amplification products. Extra bands, having additional sequences of about 220–250 bp are also detected. These additional bands can be explained by the presence of an unspliced intron in the sequence of the three 5' UTRs [26]. However, as their exact origin and function are for the moment unclear, they were not quan-

Table 1
Effect of TNF- α , TPA and butyrate on GGT activity

Cell line	GGT activity (mU/mg protein)			
	No treatment	TNF- α 200 U/ml	TPA 2 μ M	Butyrate 2.5 mM
HepG2	144 \pm 11.3	173 \pm 8.5	173 \pm 3.2	66 \pm 5.7*
LNCaP	30 \pm 3.5	9 \pm 0.5*	19 \pm 0.7*	23 \pm 2.8*
HeLa	16 \pm 0.8	17.8 \pm 1.5	17 \pm 1.0	19 \pm 1.8
U937	61 \pm 6.1	63 \pm 11.3	102 \pm 10.5**	66 \pm 3.1

Values represent the mean \pm S.D. of three independent experiments; * P < 0.01, ** P < 0.005 as compared to untreated cells.

tified. The intensities of the bands with the expected size were normalised for the β_2 -microglobulin signal, and the results are summarised in Table 2.

All three mRNA subtypes were detected in the four cell lines. However, in HepG2 cells subtype B GGT mRNA was the major form, while LNCap and HeLa cells expressed more subtype A. In U937 cells subtypes A and C are expressed almost at the same level. In HeLa and U937 cells subtype B was detected after five additional cycles of amplification. Thus, although the values for this subtype seem higher than those for subtypes A and C, its expression level is less important.

Challenge of the cells with the different mediators resulted in a cell type and mRNA subtype specific modulation.

In HepG2 cells TNF- α and TPA treatments induced GGT mRNA subtype A (1.4-fold) but did not have any

effect on subtypes B and C. As shown before, these treatments had no significant effect on the total GGT mRNA level (Fig. 1B), although slight increases ($\sim 20\%$) in enzyme activity were observed (Table 1). This could be explained by the small changes in the level of subtype A mRNA. Butyrate treatment decreased by almost 50% all three subtypes. This decrease explains the lower level of GGT total mRNA (Fig. 1B) and activity (Table 1) after this challenge.

In LNCap cells we showed before a pronounced decrease of total GGT mRNA level by 80%, 58%, 26%, after TNF- α , TPA and butyrate treatment respectively. Accordingly, all three GGT mRNA subtypes were decreased after the same treatments, except subtype B whose level remained the same after butyrate challenge.

In HeLa cells, treatment with TNF- α did not significantly modulate the level of the three mRNA subtypes.

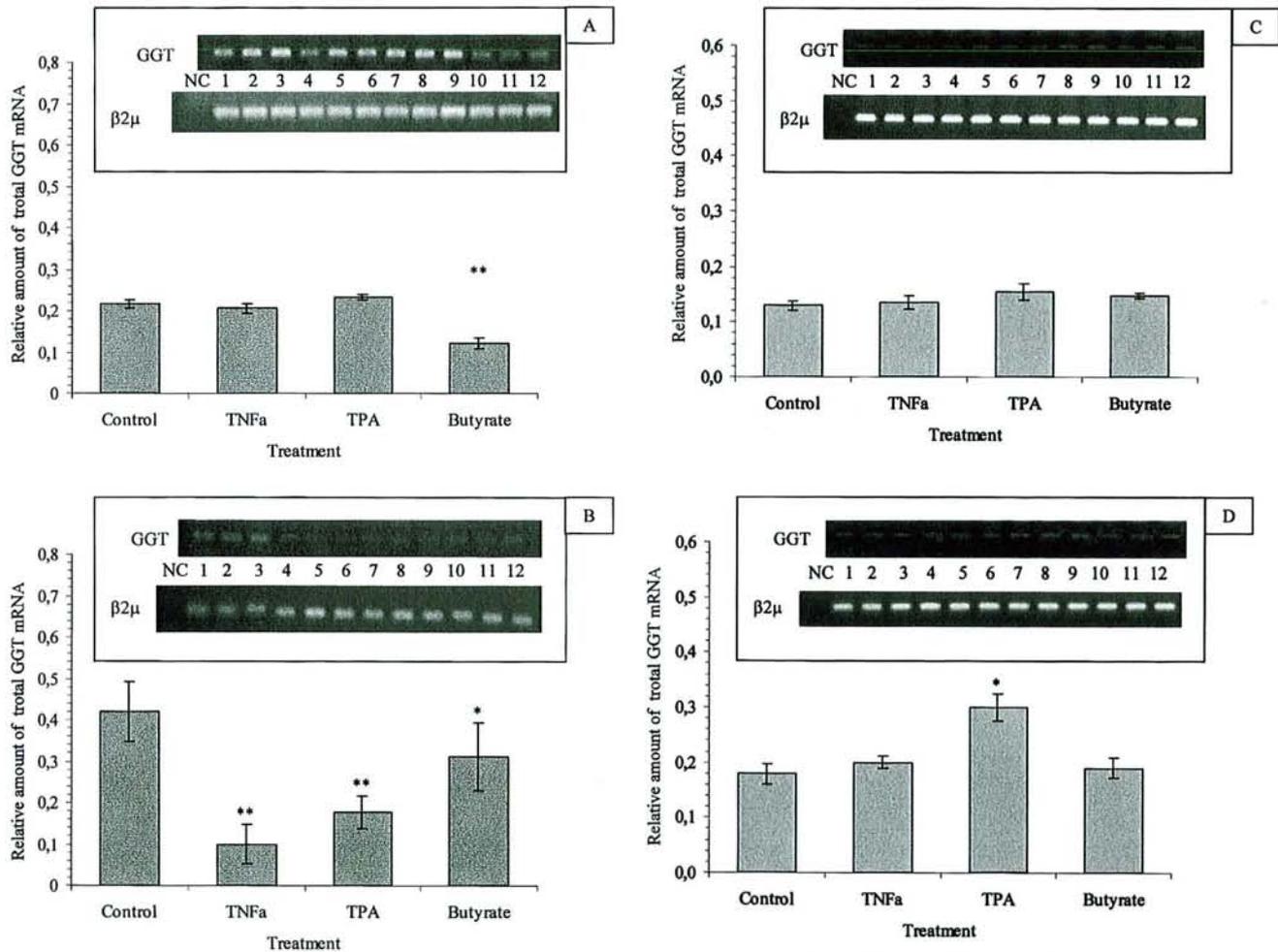


Fig. 1. Modulation of GGT total mRNA. 4 μ g of total RNA from HepG2 (A), LNCap (B), HeLa (C) and U937 (D) cells was reverse transcribed and submitted to polymerase chain reaction as described in Section 2. Each treatment was performed three times; β_2 -microglobulin ($\beta_2\mu$) and GGT signals were quantified for each sample after separation of PCR products on agarose gel containing ethidium bromide as described in Section 3. The relative amount of GGT total mRNA was obtained by the ratio GGT signal/ β_2 -microglobulin signal. Data shown are means \pm S.D. of three experiments. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.005$, as compared to control signal. (Inserts) Photographs of the corresponding agarose gels used for the quantification of GGT and β_2 -microglobulin signals; samples 1–3, control cells; 4–6, TNF- α 200 U/ml; 7–9, TPA 2 μ M; 10–12, butyrate 2.5 mM. NC, negative control; PCR was performed with both primers in the absence of any RT sample.

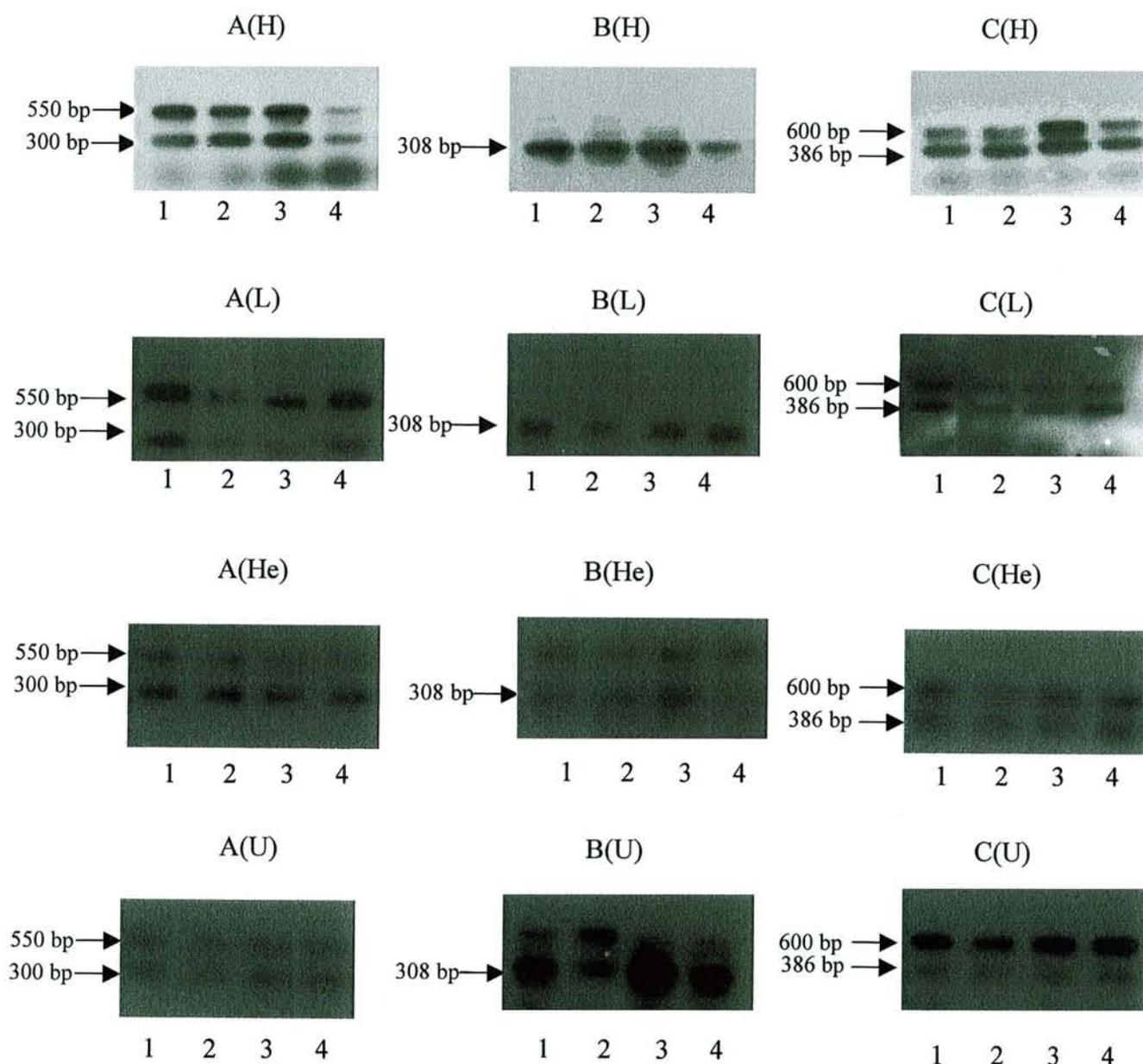


Fig. 2. Modulation of human GGT mRNA subtypes. 4 μ g of total mRNA isolated from HepG2 (H), LNCap (L), HeLa (He) or U937 (U) cells were reverse transcribed and 1 μ l of the reaction products was submitted to PCR followed by Southern blot using primers specific for subtype A (fetal liver subtype, panels A(H), A(L), A(He) and A(U)), subtype B (HepG2 subtype, panels B(H), B(L), B(He) and B(U)) and subtype C (placenta subtype, panels C(H), C(L), C(He) and C(U)). Lanes: 1, control cells; 2, TNF- α ; 3, TPA; 4, butyrate. The arrows indicate the bands and the numbers on the left of each arrow the corresponding size. The expected sizes are: 300, 308 and 386 pb for respectively subtype A, B and C.

This corresponds well to the low variations in GGT activity and total GGT mRNA level. TPA treatment induced both B and C subtypes but slightly decreased subtype A which is the major GGT mRNA subtype in these cells. Butyrate treatment resulted in a dramatic decrease of subtype B GGT mRNA but in an induction of subtypes A (1.5-fold) and C (2-fold). However, these variations resulted in the preservation of total GGT mRNA level (Fig. 1C) and enzymatic activity (Table 1).

In U937 cells butyrate treatment did not result in any

modulation of the different GGT mRNA subtypes. In the same cells a small decrease of subtype A and C levels was observed after TNF- α treatment. TPA challenge increased twice the level of subtype B mRNA and to a lesser extent subtype C, explaining the induction of total GGT mRNA level and GGT activity by 2-fold.

Taken together these results show that the changes in the level of the different GGT mRNA subtypes in these cell lines are well correlated with the levels of the total GGT mRNA and with the enzymatic activity. They also

suggest that the three mRNA subtypes account at least for the major part, if not for all, of the total GGT mRNA level in these cells.

4. Discussion

Most studies on the regulation of GGT mRNAs have been performed using rat and mouse models. For instance, it has been reported that rat GGT mRNA III is induced in rat hepatocytes in response to ethoxyquin [27], and in rat alveolar type II cells in response to quinone toxicity [28]. Rat mRNA II and mRNA IV have also been shown to respond to an oxidative stimulus in epididymis [29].

In humans, the more complex GGT gene organisation prevented rapid progress in the understanding of the regulation mechanisms which govern its expression. For example, it is not yet clear if subtype A, subtype B and subtype C mRNAs, transcribed from the same gene [15], are controlled by different promoters or if they are the result of different splicing events.

Total GGT mRNA has been shown to increase after androgen treatment in A2780 ovarian cancer cells [30]. Also, azacytidine treatment of LNCap and PC3 human prostate cells increased the level of subtype B and subtype C GGT mRNAs [31]. These increases were well correlated with the methylation status of GGT gene and with the increase of enzyme activity.

The distribution of the GGT mRNA subtypes in different human organs has been studied by Tsutsumi et al. [21]. They showed that subtype A was widely distributed in human tissues while subtype C was found only in oesophagus and kidney. In our work, in order to study the expression and regulation of GGT type I mRNAs we used four cell lines each derived from different cancer tissues: HepG2, human hepatocellular carcinoma, U937, human leukaemia, LNCap, prostate adenocarcinoma, and HeLa, human cervical epitheloid carcinoma. These cell lines also differ in their GGT activity.

The three GGT mRNA subtypes examined here were detected in all cell lines. However, subtype B was the major mRNA in HepG2 cells, subtype A in LNCap and HeLa cells and subtypes A and C in U937 cells (Table 2). Our results for the HepG2 cells are in accordance with those previously published [21], but to our knowledge, in all human tissues examined so far, the simultaneous presence of these three GGT mRNA subtypes has not been reported. This discrepancy may be explained if we assume that either in cancer cell lines the expression of GGT mRNAs is altered or that our detection protocol is more sensitive, thus detecting very low levels of the three GGT mRNA subtypes.

Our results also show that the different GGT mRNA subtypes are regulated independently and on a cell specific basis. For instance, TPA treatment induced subtype B in U937 cells but not subtype A while the contrary was ob-

Table 2

Effect of TNF- α , TPA and butyrate on the expression of each GGT mRNA subtype

Treatment	GGT mRNA subtype		
	A	B	C
<i>HepG2</i>			
Control	0.59	1.08	0.71
TNF- α	0.82 (\uparrow)	1.03 (=)	0.90 (\uparrow)
TPA	0.85 (\uparrow)	1.13 (=)	0.85 (\uparrow)
Butyrate	0.32 (\downarrow)	0.44 (\downarrow)	0.44 (\downarrow)
<i>LnCap</i>			
Control	2.25	1.50	0.51
TNF- α	0.40 (\downarrow)	0.44 (\downarrow)	0.18 (\downarrow)
TPA	0.50 (\downarrow)	1.13 (\downarrow)	0.07 (\downarrow)
Butyrate	1.60 (\downarrow)	1.40 (=)	0.30 (\downarrow)
<i>HeLa</i>			
Control	0.67	0.74 ^a	0.29
TNF- α	0.41 (\downarrow)	0.62 ^a (=)	0.31 (=)
TPA	0.53 (=)	1.05 ^a (\uparrow)	0.55 (\uparrow)
Butyrate	1.01 (\uparrow)	nd ^a (\downarrow)	0.64 (\uparrow)
<i>U937</i>			
Control	0.66	1.43 ^a	0.71
TNF- α	0.45 (\downarrow)	1.08 ^a (=)	0.61 (\downarrow)
TPA	0.65 (=)	2.75 ^a (\uparrow)	0.89 (\uparrow)
Butyrate	0.65 (=)	1.50 ^a (=)	0.75 (=)

Cells were treated with either 200 U/ml TNF- α , 2 μ M TPA or 2.5 mM butyrate for 24 h. Specific GGT mRNAs were detected after PCR and Southern blot. Bands were quantified and the values normalised with the corresponding β_2 -microglobulin signal. Values are from one out of three experiments which gave the same pattern. nd, not detected; \uparrow , increase; \downarrow , decrease; =, no change in the mRNA subtype level.

^aSubtype B mRNA was detected after 35 cycles.

served in HepG2 cells. Butyrate treatment induced subtype C in HeLa cells but down-regulated the same mRNA in HepG2 and LnCap cells, while no changes were observed after the same treatment of U937 cells (Table 2). However, the mechanisms by which each treatment influences these mRNA levels may be difficult to elucidate as TNF- α , TPA and butyrate can have pleiotropic effects. It has been shown that TNF- α increases the expression of another enzyme related to GSH metabolism, the γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) by activating the transcription of its mRNA, probably through an API/metal response element [32]. In KG-1 human leukaemia cells, it has been demonstrated that TNF- α challenge increases the WAF1 mRNA half-life by 5-fold without any noticeable enhancement of the transcription rate [33].

But, in HeLa cells, it has been shown by Northern blot and nuclear transcription analyses that TNF- α as well as interferon- γ (IFN- γ) reduced within 1–3 h the *c-myc* messenger RNA levels as a result of transcriptional inhibition. However, while the reduction of *c-myc* messenger RNA by IFN- γ was dependent on a new protein synthesis, the inhibitory effect of TNF- α on *c-myc* messenger RNA was direct and was not abrogated by cycloheximide, these results suggest that IFN- γ and TNF- α reduce *c-myc* transcription through different molecular mechanisms. Treatment was shown to down-regulate the expression of *c-myc*

by inhibition of the transcription level [34], and to cooperate with interferon- γ for this effect. Sodium butyrate can also modulate gene expression via different mechanisms: in HepG2 cells it has been reported to increase alkaline phosphatase expression by enhancing the rate of transcription [35], but to inhibit the expression of the cholesterol acyl transferase gene by a post-transcriptional mechanism, involving increased degradation of the corresponding pre-mRNA. In rat liver, Dierickx et al. [36] suggested that butyric acid can also directly interact with glutathione *S*-transferase via its carboxyl groups, and hence inhibits the enzyme activity at the post-translational level.

The organisation of the human GGT gene has been described recently and only the promoter directing the transcription of subtype B GGT mRNA I has been partially characterised [26]. It presents several API-like response elements which may be responsible to the modulation of this GGT mRNA I subtype by TNF- α and TPA.

Further work at the GGT gene level is in progress to elucidate the mechanisms which control the expression of each mRNA subtype.

Acknowledgements

The authors would like to thank for partial funding of this work the Ligue Nationale contre le Cancer, the Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique (ARERS) and La Région Lorraine. S.D. was supported by a grant from the Ligue Nationale contre le Cancer, and M.J.A. was supported by a grant from ARERS and La Région Lorraine. I.P. was supported by a grant from the Norwegian Research Council.

References

- [1] S.S. Tate, A. Meister, *Mol. Cell. Biochem.* 39 (1981) 357–368.
- [2] S. Siegrist, E. Jacquemin, F. Bulle, J.F. Bernaudin, M. Wellman, R.N. Hugon, G. Guellaën, M. Hadchouel, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 11 (1990) 89–95.
- [3] M.H. Hanigan, H.C. Pitot, *Carcinogenesis* 6 (1985) 165–172.
- [4] M.H. Hanigan, H.F. Frierson Jr., J.E. Brown, M.A. Lovel, P.T. Taylor, *Cancer Res.* 54 (1994) 286–290.
- [5] H.F. Frierson Jr., D. Theodorescu, S.E. Mills, M.H. Hanigan, *Mod. Pathol.* 10 (1997) 1–6.
- [6] B.R. DeYoung, H.F. Frierson Jr., P.E. Swanson, M.H. Hanigan, *Mod. Pathol.* 9 (1996) 144A.
- [7] A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 3070–3074.
- [8] Z. El-akawi, J. Zdanowicz, P.J. Creaven, H.M. Abu, R. Perez, L. Pendyala, *Oncol. Res.* 8 (1996) 415–423.
- [9] O. Borud, B. Mortensen, I.M. Mikkelsen, P. Leroy, M. Wellman, N.E. Huseby, *Int. J. Cancer* 88 (2000) 464–468.
- [10] B. Del Bello, A. Paolicchi, M. Comporti, A. Pompella, E. Maellaro, *FASEB J.* 13 (1999) 69–79.
- [11] A. Paolicchi, R. Tongiani, P. Tonarelli, M. Comporti, A. Pompella, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 853–860.
- [12] S. Dominici, M. Valentini, E. Maellaro, B. Del Bello, A. Paolicchi, E. Lorenzini, R. Tongiani, M. Comporti, A. Pompella, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 623–635.
- [13] M.J. Accaoui, M. Enoiu, M. Mergny, C. Masson, S. Dominici, M. Wellman, A. Visvikis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 1062–1067.
- [14] C. Courtay, N. Heisterkamp, G. Siest, J. Groffen, *Biochem. J.* 297 (1994) 503–508.
- [15] H. Leh, N. Chikhi, K. Ichino, G. Guellaën, M. Wellman, G. Siest, A. Visvikis, *FEBS Lett.* 434 (1998) 51–56.
- [16] A. Visvikis, C. Thioudellet, T. Oster, S. Fournel-Gigleux, M. Wellman, G. Siest, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7361–7365.
- [17] D.C. Goodspeed, T.J. Dunn, D.D. Miller, H.C. Pitot, *Gene* 76 (1989) 1–9.
- [18] A. Pawlak, E.H. Cohen, J. Octave, N. Schweickhardt, S.J. Wu, F. Bulle, N. Chikhi, J.H. Baik, S. Siegrist, G. Guellaën, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 3256–3262.
- [19] D. Sakamuro, M. Yamazoe, Y. Matsuda, K. Kangawa, N. Taniguchi, H. Matsuo, H. Yoshikawa, N. Ogasawara, *Gene* 73 (1988) 1–9.
- [20] E. Rajpert-De Meyts, N. Heisterkamp, J. Groffen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8840–8844.
- [21] M. Tsutsumi, D. Sakamuro, A. Takada, S.C. Zang, T. Furukawa, N. Taniguchi, *Hepatology* 23 (1996) 1093–1097.
- [22] M. Diederich, M. Wellman, A. Visvikis, A. Puga, G. Siest, *FEBS Lett.* 332 (1993) 88–92.
- [23] N. Chikhi, N. Holic, G. Guellaën, Y. Laperche, *Comp. Biochem. Physiol.* 122 (1999) 367–380.
- [24] F. Schiele, J. Muller, E. Collinet, G. Siest, *Clin. Chem.* 33 (1987) 1971–1977.
- [25] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [26] A. Visvikis, A. Pawlak, M.J. Accaoui, K. Ichino, H. Leh, G. Guellaën, M. Wellman, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 317–325.
- [27] S.A. Griffiths, V.M. Good, L.A. Gordon, E.A. Hudson, M.C. Barrett, R.J. Munks, M. M. Manson, *Mol. Carcinog.* 4 (1995) 251–262.
- [28] A. Kugelman, H.A. Choy, R. Liu, M.M. Shi, E. Gozal, H.J. Forman, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 11 (1994) 586–592.
- [29] C.M. Markey, D.B. Rudolph, J.C. Labus, B.T. Hinton, *J. Androl.* 19 (1998) 92–99.
- [30] M.O. Ri le, P.A. Pickhardt, G. Wilding, *Cancer Res.* 57 (1997) 2428–2433.
- [31] M. El Yaagoubi, A. Visvikis, A. Khalid, G. Siest, M. Wellman, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46 (1998) 321–331.
- [32] A. Morales, C. Garcia-Ruiz, M. Miranda, M. Mari, A. Collet, E. Ardite, J.C. Fernandez-Checa, *J. Biol. Chem.* 48 (1997) 30371–30379.
- [33] M. Shiohara, M. Akashi, A.F. Gombart, R. Yang, H.P. Koefler, *J. Cell. Physiol.* 166 (1996) 568–576.
- [34] A. Yarden, A. Kimchi, *Science* 4482 (1986) 1419–1421.
- [35] K.N. Khan, T. Tsutsumi, K. Nataka, Y. Kato, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14 (1999) 156–162.
- [36] P.J. Dierickx, *Res. Chem. Pathol. Pharmacol.* 45 (1984) 471–474.

RESULTATS 2^{ème} PARTIE

2. Partie II : Rôle de la GGT dans la réponse cellulaire au CDDP et au carboplatine

La deuxième partie de notre travail porte sur le rôle de la GGT dans la réponse cellulaire au CDDP et au carboplatine, deux composés fréquemment utilisés dans le traitement de tumeurs solides. L'utilisation de ces composés est souvent freinée par l'apparition de résistances dont les origines sont difficiles à connaître et à contrecarrer. Le rôle du GSH intracellulaire et de la γ GCS dans les résistances a fait l'objet de très nombreuses études alors que celui de la GGT n'a que très peu été abordé. C'est pourquoi dans cette partie du travail, nous avons étudié la régulation de la GGT par le CDDP et le carboplatine ainsi que l'effet de la surexpression de cette enzyme sur la résistance cellulaire à ces deux composés.

Les résultats relatifs au CDDP ont fait l'objet d'une publication présentée à la fin de la deuxième partie :

« Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase ». *Biochem Pharmacol.* (2002), 64, 207-16.

Daubeuf S, Leroy P, Paolicchi A, Pompella A, Wellman M, Galteau MM, Visvikis A.

2.1. Régulation de la GGT par les dérivés du platine

L'établissement de lignées cellulaires résistantes aux CDDP et à ses dérivés conduit souvent à une augmentation de la concentration intracellulaire du GSH ainsi qu'à une induction des activités γ GCS et GGT. Par contre, on ne sait pas si un traitement unique et de courte durée par ces molécules (donc avant l'acquisition de ces résistances) module ces paramètres dans des lignées humaines. Afin de connaître l'effet de ces composés sur l'expression de la GGT, nous avons traité les cellules HeLa par du CDDP ou du carboplatine pendant 24 ou 48 H.

Les résultats présentés dans la Figure 38 montrent que un traitement au CDDP induit l'activité GGT dans les cellules HeLa, et ceci dès 24 H après le début du traitement. L'induction la plus importante (environ 3 fois) est obtenue pour les concentrations 2,5 et 5 μM et après 48 H de traitement.

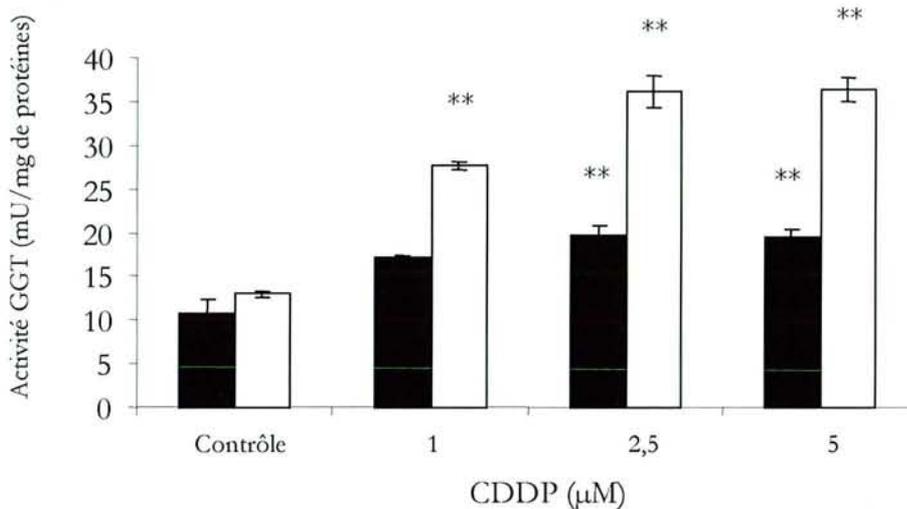


Figure 38 : Modulation de l'activité GGT par le CDDP dans les cellules HeLa. Les cellules HeLa sontensemencées en plaques 6 puits et traitées pendant 24 heures (■) ou 48 heures (□) par 1, 2,5 ou 5 μM de CDDP. Les valeurs contrôles correspondent aux activités GGT mesurées pour les cellules non traitées. Les résultats correspondent à la moyenne et à l'écart type calculés à partir de 3 essais.

** $p < 0.005$ par rapport aux cellules contrôles (non traitées) au même temps.

Afin de déterminer si cette induction est liée à une augmentation de la synthèse de l'enzyme, nous avons mesuré le taux d'ARNm total de la GGT par PCR semi-quantitative (Figure 39). Les résultats présentés correspondent à la moyenne obtenue pour deux essais. Nous constatons que le taux de l'ARNm I_T de la GGT est induit de 2 fois après 24 heures de traitement par 2,5 ou 5 μM de CDDP. Ainsi, l'induction de l'activité GGT observée est dépendante de l'induction de l'ARNm correspondant.

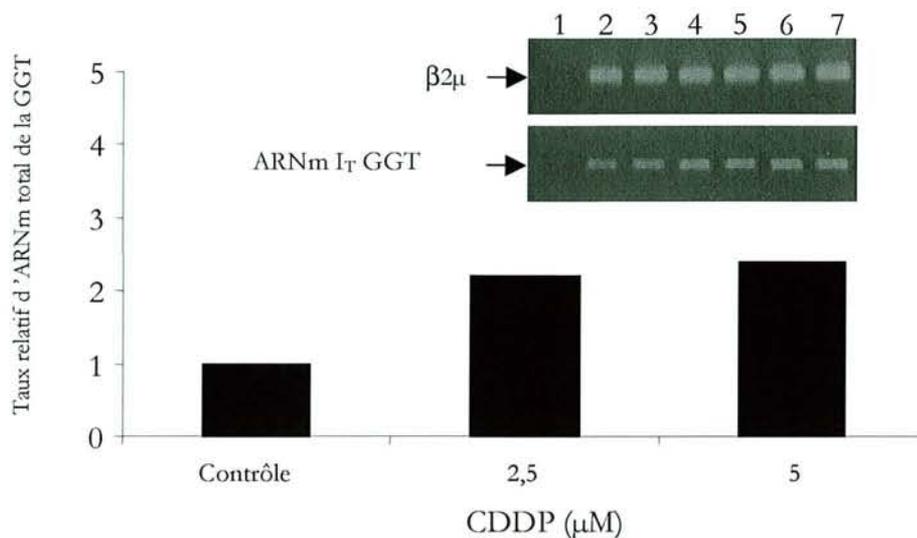


Figure 39 : Modulation du taux de l'ARNm I_T par le CDDP dans les cellules HeLa

Les cellules ont été traitées pendant 24 heures par 2,5 ou 5 μM de CDDP avant l'extraction de l'ARN total. 4 μg d'ARN total sont soumis à une transcription inverse suivie des PCR spécifiques (matériel et méthode section 2.6.2). Les produits de PCR pour la β₂-microglobuline et pour l'ARNm total de la GGT ont été quantifiés après migration sur gel d'agarose. Le taux relatif d'ARNm total de la GGT est obtenu par le ratio « signal GGT/signal β₂-microglobuline ». Les données présentées correspondent à la moyenne calculée pour 2 expériences : ligne 1 : contrôle négatif (PCR effectuée avec les 2 couples d'amorce, mais sans produit de transcription inverse) ; lignes 2 et 3 : cellules non traitées ; lignes 4 et 5 : cellules traitées par du CDDP 2,5 μM ; lignes 6 et 7 : cellules traitées par du CDDP 5 μM.

Nous avons ensuite étudié la régulation relative des deux sous types de l'ARNm I majoritaires dans la lignée HeLa : les sous types A et C (le sous type B étant largement minoritaire, (Tableau VII). La Figure 40 présente les résultats des Southern blot pour les sous types A et C, ainsi que la quantification des bandes d'intérêt.

Après traitement par 2,5 et 5 μM de CDDP, l'ARNm I_A est induit de 5 et 7 fois respectivement, et l'ARNm I_C est induit 4 fois après les deux traitements. Donc, l'augmentation du taux de l'ARNm I_T est due au moins à l'induction de ces deux sous types.

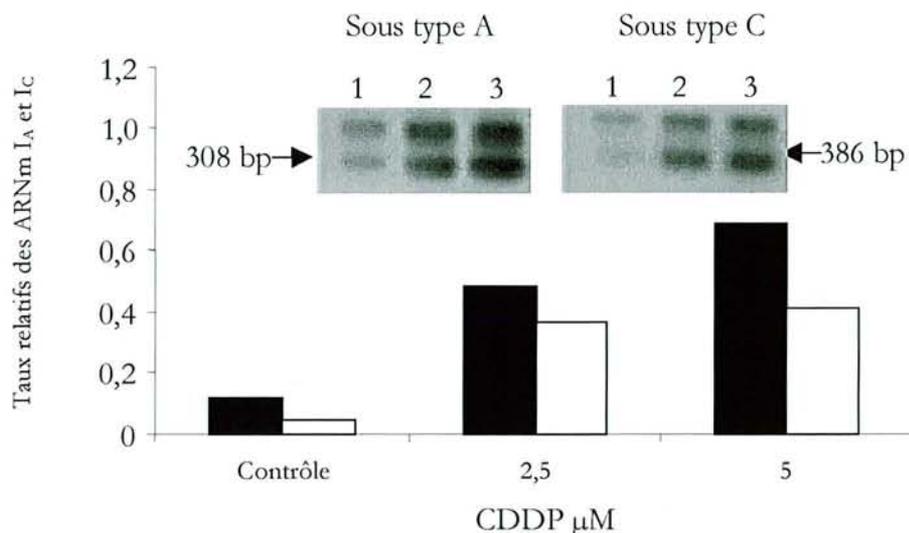


Figure 40 : Modulation des ARN I_A et I_C par le CDDP dans les cellules HeLa. Les produits de transcription inverse ont été soumis aux PCR spécifiques pour les sous types A et C suivies des southern blot. Les photos correspondent aux southern blot qui ont servi à la quantification de la bande de 308 pb pour le sous type A (■) et celle de 386 pb pour le sous type C (□). Ligne 1 : cellules non traitées ; ligne 2 : CDDP 2,5 µM ; ligne 3 : CDDP 5 µM. Les taux relatifs des sous types A et C sont obtenus par le ratio signal pour la GGT / signal pour la β_2 -microglobuline.

L'ensemble de ces résultats montre qu'une des réponses précoces des cellules HeLa au traitement au CDDP est l'augmentation de la synthèse et de l'activité GGT.

La mesure de l'activité GGT après le traitement par le carboplatine a été réalisée après 48 heures de traitement (temps également utilisé pour l'évaluation de la cytotoxicité de ce composé). Là encore nous observons une augmentation de l'activité GGT (de $14,6 \pm 0,5$ à $21,6 \pm 1,2$ mU/mg de protéine pour la dose 50 µM) indiquant que le carboplatine, comme le CDDP induit l'expression de cette enzyme (Figure 41), et ce probablement par les mêmes mécanismes. Les cellules sont traitées pendant plus longtemps et par des doses plus fortes à cause de la moindre réactivité du carboplatine.

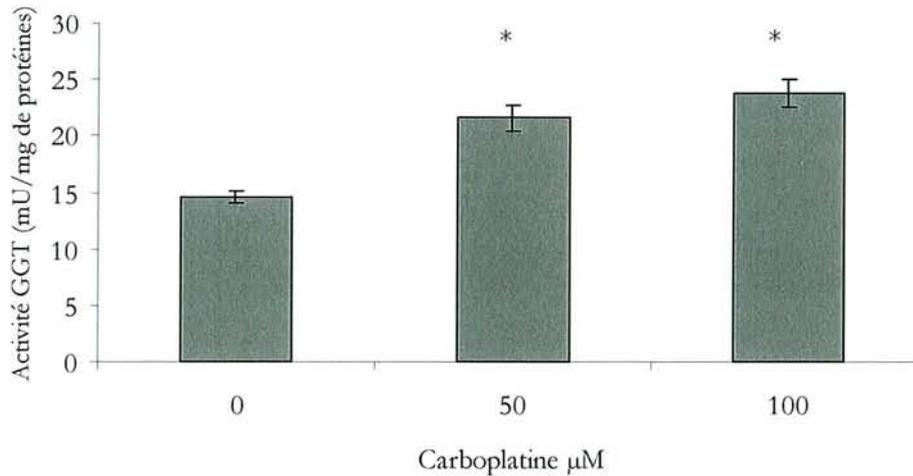


Figure 41 : Modulation de l'activité GGT par le carboplatine dans les cellules HeLa. Les cellules sont traitées pendant 48 heures par du carboplatine à 50 ou 100 μM . Les résultats correspondent à la moyenne et à l'écart type obtenus pour 3 essais ; * : $p < 0,01$ par rapport à l'activité GGT mesurée pour les cellules HeLa non traitées.

2.2. Régulation du taux de glutathion intracellulaire par les dérivés du platine

Nous avons ensuite étudié l'effet d'un traitement par le CDDP et le carboplatine sur le contenu intracellulaire en GSH des cellules HeLa. Les cellules ont été traitées par 5 μM de CDDP pendant 24 H, ou par 50 μM de carboplatine pendant 48 H. La mesure de la concentration intracellulaire en GSH a été mesurée par CLHP. Comme le montre la Figure 42, le traitement par le CDDP conduit à une augmentation d'environ 25 % du contenu intracellulaire en GSH, et le traitement par le carboplatine de 33 %.

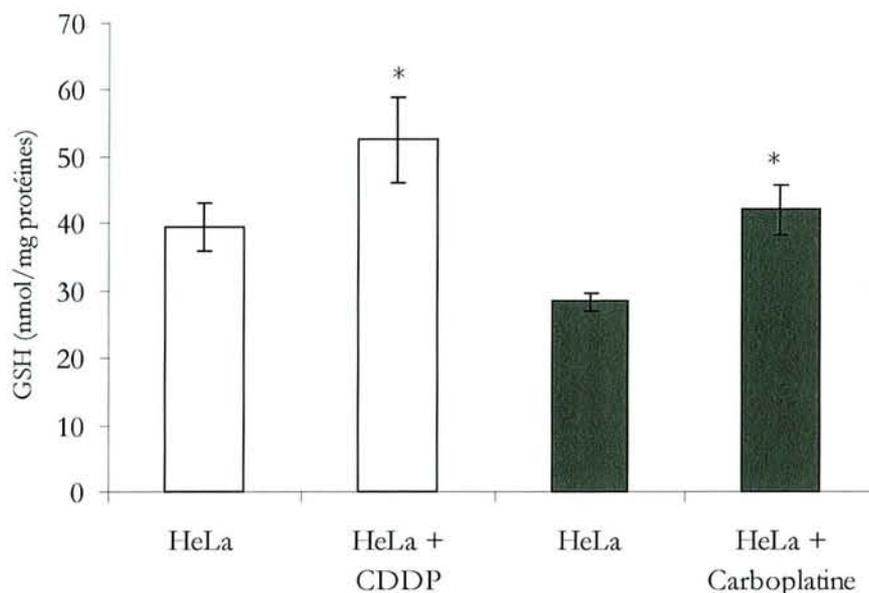


Figure 42 : GSH intracellulaire dans la lignée HeLa après 24 heures de culture avec ou sans traitement par 5 μ M de CDDP (\square), ou après 48 heures de culture avec ou sans traitement par 50 μ M de carboplatine(\blacksquare).

2.3. Etablissement et caractérisation de la lignée

HeLa-GGT

Nous avons donc montré que le traitement par le CDDP ou par son dérivé, le carboplatine induit de façon rapide la synthèse de la GGT et du GSH. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné précédemment, la résistance cellulaire aux dérivés du platine est multifactorielle. Pour évaluer uniquement la participation de la GGT dans la défense cellulaire contre ces médicaments, nous avons établi une lignée cellulaire exprimant de manière stable la GGT. Afin d'établir cette lignée, les cellules HeLa ont été transfectées par l'ADNc codant la GGT humaine, et soumises à une sélection par l'hygromycine (100 μ g/ml) pendant 2 à 3 mois (jusqu'à stabilisation de leur niveau d'expression de l'enzyme). Nous avons obtenu plusieurs lignées différentes par leur activité GGT comprises entre 15 mU/mg de protéines (équivalent à l'activité GGT de la lignée parentale HeLa) à plus 1000 mU/mg de protéines. Parmi ces lignées, nous avons choisi de travailler avec un clone possédant une activité de 150 mU/mg de protéines (soit 10 fois l'activité de la lignée parentale HeLa) et que nous appellerons HeLa-GGT. En effet,

ce degré d'expression est équivalent à celui retrouvé dans les cellules intestinales humaines ou dans certaines cellules cancéreuses ou enfin, dans des lignées établies (par exemple la lignée HepG2). De plus, ce clone montre une bonne stabilité de l'expression de l'enzyme. Les constantes cinétiques de l'enzyme de la lignée HeLa-GGT sont comparables à celles décrites pour l'enzyme humaine native ou recombinante (Visvikis *et al*, 1991).

2.4. Influence de l'activité GGT sur le GSH intracellulaire

Le taux de GSH intracellulaire est souvent impliqué dans les mécanismes de défense cellulaire contre les dérivés du platine. Sa concentration est dépendante de l'activité γ -GCS et de l'approvisionnement en cystéine. Or, cet approvisionnement dépend de la concentration en cystéine du milieu extracellulaire, de la concentration en GSH extracellulaire et de l'activité GGT. Nous avons alors voulu vérifier que la surexpression de la GGT et la composition du milieu de culture influençaient le contenu en GSH intracellulaire. Les 2 lignées cellulaires (HeLa et HeLa-GGT) ont été cultivées dans des milieux différant par leur contenu en cystéine et/ou en GSH :

- Le milieu de culture usuel DMEM, contenant de la cystine à une concentration de 250 μ M et pas de GSH (DMEM 250 μ M cys).
- Le milieu DMEM appauvri en cystine, contenant 50 μ M de cet acide aminé ce qui correspond approximativement à sa concentration plasmatique (DMEM 50 μ M cys).
- Enfin, le DMEM 50 μ M cys additionné de GSH à une concentration de 50 μ M (DMEM 50 μ M cys + 50 μ M GSH).

Les cellules ont été mises en culture soit dans le milieu DMEM 250 μ M cys, soit dans le milieu DMEM 50 μ M cys. 24 heures après l'ensemencement des cellules, le milieu de culture a été remplacé par du milieu DMEM 250 μ M cys, du milieu DMEM 50 μ M cys, ou du milieu DMEM 50 μ M cys + 50 μ M GSH. Les dosages du GSH intracellulaire ont été réalisés 24 et 48 heures après le changement du milieu de culture.

Tableau X : Concentration en GSH intracellulaire des cellules HeLa et HeLa-GGT en fonction des conditions de culture.

Milieu d'ensemencement, traitement et durée	GSH (nmol/mg de protéines)	
	HeLa	HeLa-GGT
DMEM 250 μ M cys		
24 H	39,2 \pm 7,7	36,2 \pm 0,7
48 H	31 \pm 2,7	27 \pm 2,6
DMEM 50 μ M cys		
24 H	2,2 \pm 0,6	2,7 \pm 0,5
48 H	1,1 \pm 0,3	0,4 \pm 0,1
DMEM 50 μ M cys		
+ GSH 50 μ M 24 H	6,1 \pm 1,2 ** ^a	19,1 \pm 3,0 ** ^{a,b}
+ GSH 50 μ M 48 H	12,9 \pm 1,0 ** ^a	9,5 \pm 1,2 ** ^{a, *b}

* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$: ^a : par rapport à la même lignée cellulaire cultivée dans le DMEM 50 μ M et traitées par le même milieu et pour des temps de traitement identiques ; ^b : par rapport à la lignée HeLa cultivée et traitée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cellules HeLa et HeLa-GGT sont cultivées en continu dans le milieu DMEM 250 μ M cys, (Tableau X), elles présentent le même taux de GSH intracellulaire (39,2 \pm 7,7 et 36,2 \pm 0,7 nmol/mg de protéines respectivement après 24 H ; 31 \pm 2,7 et 27 \pm 2,6 nmol/mg de protéines respectivement après 48 H). Dans ces conditions, la cystéine étant présente en concentration suffisante, elle ne limite pas la synthèse du GSH intracellulaire et le taux d'expression de la GGT ne modifie pas significativement le taux de GSH quel que soit le temps de culture. La légère diminution observée après 48 heures de culture, pourrait être due à une diminution du taux de cystéine disponible dans le milieu extracellulaire.

Quand le milieu de culture ne contient que 50 μ M de cystine, nous observons un effondrement de la concentration en GSH intracellulaire de plus de 90 % par rapport aux concentrations mesurées dans le milieu contenant 250 μ M cystine, et ceci quelle que soit la lignée et le temps de culture. Dans ces conditions, le niveau de l'activité GGT n'influence pas la concentration du

GSH intracellulaire. Il est important de souligner que, malgré la faible quantité de GSH intracellulaire la viabilité des cellules n'est pas affectée.

Par contre, lorsque la cystéine est fournie aux cellules sous forme de GSH (par l'intermédiaire du milieu 50 μM cys + 50 μM GSH), les cellules HeLa après 24 H de traitement ne récupèrent qu'une faible partie de leur GSH (de $2,2 \pm 0,6$ à $6,1 \pm 1,2$ nmol/mg de protéines). Les cellules HeLa-GGT, sont apparemment capables d'utiliser le GSH comme source de cys de façon plus efficace que les cellules HeLa, et après 24 heures elles récupèrent 50 % de leur GSH intracellulaire (de $2,7 \pm 0,5$ à $19,1 \pm 3$ nmol/mg de protéines). Cependant, après 48 heures de traitement, le GSH intracellulaire des cellules HeLa continue d'augmenter (de $6,1 \pm 1,2$ à $12,9 \pm 1,1$ nmol/mg de protéines), alors que celui des cellules HeLa-GGT diminue de $19,1 \pm 3$ à $8,5 \pm 1,2$ nmol/mg de protéines.

Ces derniers résultats pourraient s'expliquer par la différence d'activité GGT entre les deux lignées. Les cellules HeLa-GGT ayant une plus forte activité GGT dégraderaient rapidement le GSH extracellulaire et amélioreraient ainsi leur approvisionnement en cys. Néanmoins, le milieu serait alors rapidement appauvri en GSH, ce qui aurait comme conséquence la diminution du GSH intracellulaire dans cette lignée après 48 H de culture. Les cellules HeLa ayant une faible activité GGT, dégraderaient plus lentement le GSH extracellulaire. Ainsi, la restauration de leur GSH intracellulaire serait moins rapide que celle des cellules HeLa-GGT, mais elle continuerait pendant toute la durée de la culture.

Afin d'appuyer ces hypothèses, nous avons mesuré la vitesse de dégradation du GSH et d'apparition de CysGly extracellulaires pour les deux lignées (Figure 43).

Nous pouvons constater que les cellules exprimant plus fortement la GGT sont capables de dégrader la quasi-totalité du GSH en 90 min (la vitesse de consommation mesurée dans la partie linéaire entre 0 et 30 min est de 150 nmol/min/mg de protéines), alors que dans le milieu extracellulaire des cellules HeLa il reste encore environ 85 % du GSH (la vitesse de consommation calculée dans la partie linéaire entre 30 et 90 min est de 24 nmol/min/mg de

protéines) (Figure 43 A). D'ailleurs pour ces cellules, la concentration de CysGly dans le milieu de culture reste constante et très faible pendant toute la durée de l'expérience. Au contraire, pour les cellules HeLa-GGT, nous observons une augmentation continue de ce métabolite au cours du temps (Figure 43 B).

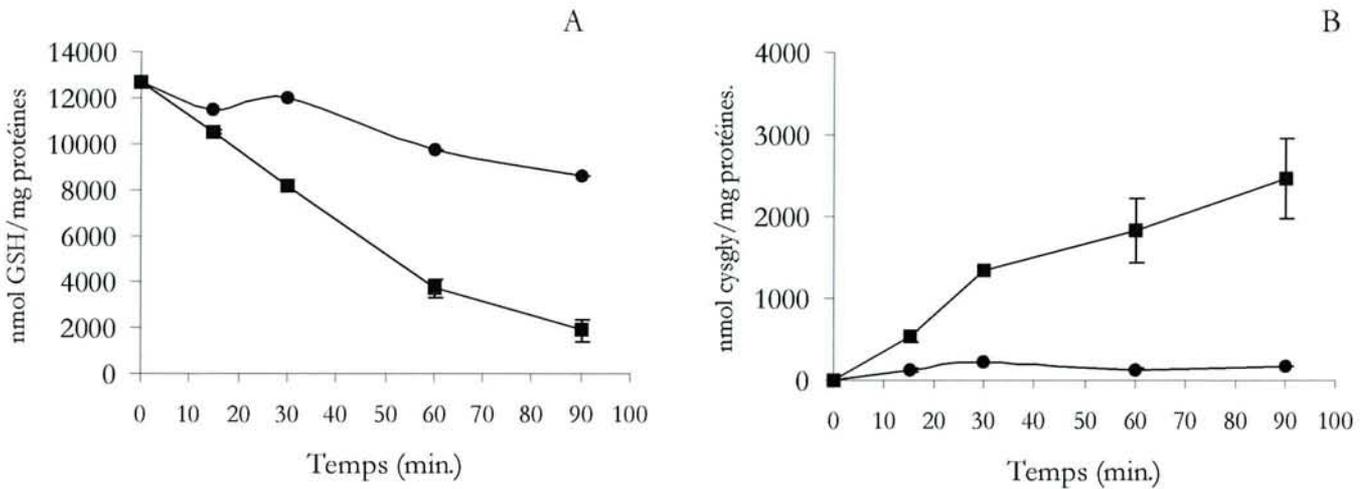


Figure 43 : Métabolisme du GSH extracellulaire et accumulation de la CysGly dans le milieu extracellulaire par les cellules HeLa et HeLa-GGT. Les cellules HeLa et HeLa-GGT ont été ensemencées en plaques de 6 puits et incubées en présence de 1 mM de GSH. Aux temps 15, 30, 60 et 90 minutes, le milieu extracellulaire des cellules HeLa (●) et HeLa-GGT (■) est prélevé pour le dosage du GSH (A) et de la CysGly (B) par CLHP. Les résultats correspondent à la moyenne et à l'écart type calculés pour 3 essais et normalisé par le contenu en protéines des échantillons.

L'ensemble de ces résultats montre que l'influence de la GGT sur la concentration du GSH intracellulaire dépend des conditions de culture et ne se met en évidence que lorsque du GSH extracellulaire est fourni aux cellules. Dans ces conditions, les cellules qui expriment fortement la GGT peuvent utiliser plus efficacement le tripeptide pour leur approvisionnement en cys. Ces expériences montrent également que l'utilisation de milieux de culture standard (enrichis en acides aminés essentiels) ne reflète pas les conditions *in vivo* pour les processus où ces acides aminés sont limitants.

2.5. Rôle de la GGT dans la résistance cellulaire au cisplatine et au carboplatine

2.5.1. Influence de la GGT et du GSH intracellulaire sur la cytotoxicité des dérivés du platine

Nous avons montré que dans certaines conditions, l'activité GGT peut influencer le contenu en GSH d'une cellule. Etant donnée l'importance du GSH sur la résistance des cellules au CDDP et à ses dérivés, nous nous sommes demandé dans quelle mesure l'activité GGT pouvait aussi influencer la résistance cellulaire à ces anticancéreux. Nos études ont été effectuées sur deux molécules, le CDDP et le carboplatine.

En utilisant nos lignées modèles HeLa et HeLa-GGT, nous avons mesuré la cytotoxicité des 2 agents (CDDP et carboplatine) dans les différentes conditions de culture décrites auparavant (Figure 44).

Pour l'évaluation de la cytotoxicité du CDDP, les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits et traitées pendant 24 heures par différentes concentrations de cette molécule.

Nous constatons que dans le milieu 250 μM cys et dans le milieu ne contenant que 50 μM de cystine, l' IC_{50} ($\approx 7,5 \mu\text{M}$) ne varie pas significativement quelles que soit la lignée ou les conditions de culture (Figure 44, A et 44, B). Pourtant, en présence de 50 μM de cystine, la concentration de GSH intracellulaire est bien inférieure par rapport à celle des cellules cultivées dans les conditions standard.

Il semble donc que pour notre modèle, le taux de GSH intracellulaire et le degré d'expression de la GGT n'influencent pas la cytotoxicité du CDDP.

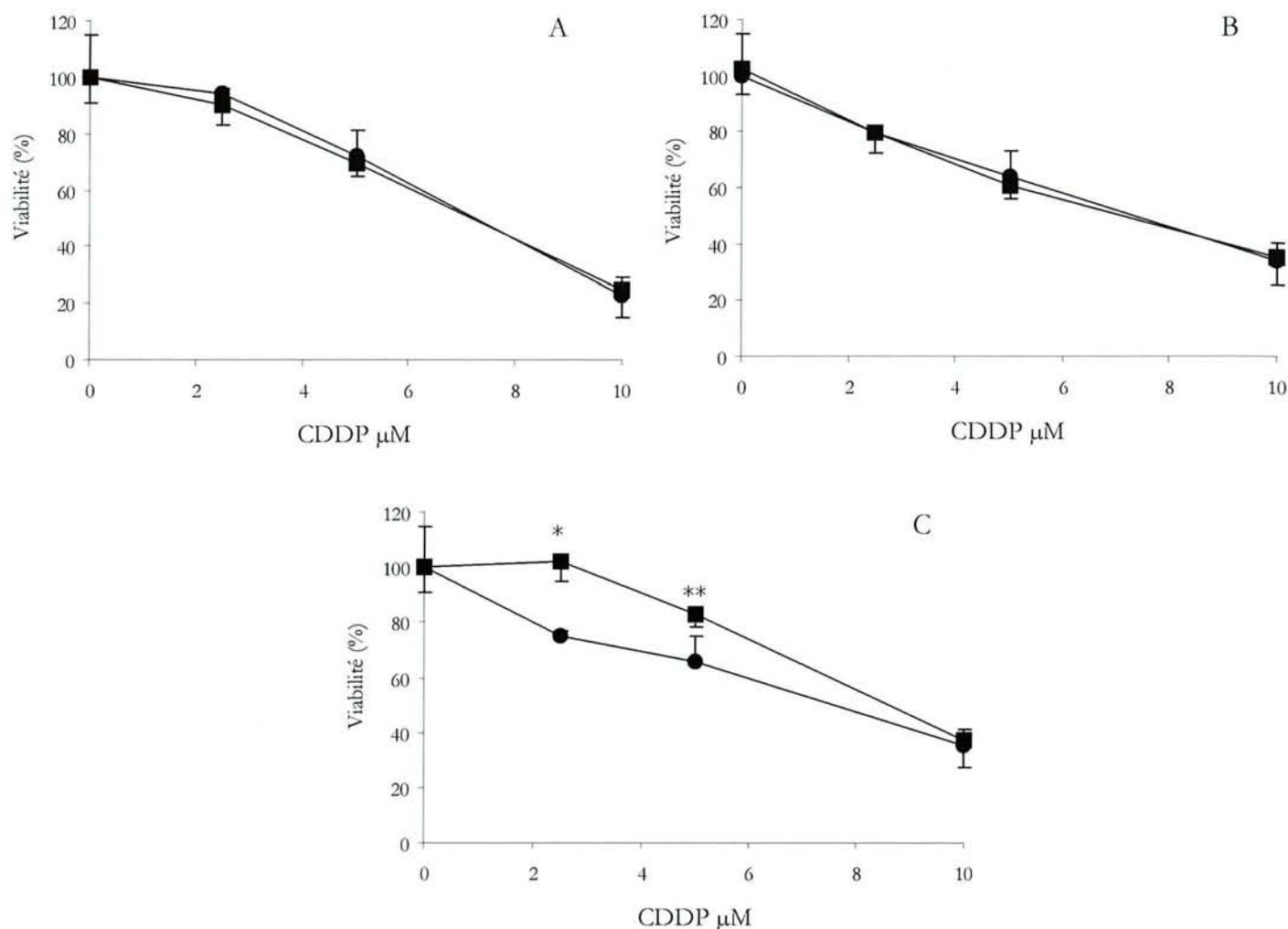


Figure 44 : Cytotoxicité du CDDP. Les cellules HeLa (●) et HeLa-GGT (■) sont traitées 24 heures dans du milieu 250 μM cys (A), 50 μM cys (B) ou 50 μM cys + 50 μM GSH (C) par différentes doses de CDDP. La valeur 100 % correspond à la viabilité des cellules HeLa ou HeLa-GGT non traitées. Les résultats correspondent à la moyenne et à l'écart type calculés à partir de 8 essais. * : $p < 0,01$ ** $p < 0,005$ par rapport à la viabilité des cellules HeLa traitées à la même dose de CDDP.

Lorsque du GSH (50 μM) est ajouté au milieu à faible concentration en cystine, les cellules HeLa-GGT deviennent plus résistantes pour les traitements à 2,5 et 5 μM (Figure 44, C). Nous avons montré précédemment que dans ces conditions les cellules HeLa-GGT ont une concentration en GSH intracellulaire supérieure à celle des cellules HeLa. Pourtant, les Figures 44 A et 44 B montrent que la concentration en GSH intracellulaire n'est pas un facteur déterminant la résistance au CDDP. On peut supposer qu'en présence de GSH, les cellules HeLa-GGT ont une capacité de renouvellement du GSH intracellulaire consommé supérieure à celle des cellules HeLa et que cela pourrait influencer sur la cytotoxicité du CDDP.

Néanmoins, sachant que l'activité γ GCS est identique dans les cellules HeLa et HeLa-GGT ($62 \pm 2,5$ et 58 ± 2 nmol γ -GluCys formées/min/mg de protéines respectivement), en présence de 250 μ M de cystine la vitesse de renouvellement du GSH devrait être identique pour les deux lignées et bien supérieure à celle des cellules HeLa-GGT cultivées en présence de GSH. La plus grande résistance des cellules HeLa-GGT ne peut donc pas être entièrement expliquée par le meilleur renouvellement du GSH intracellulaire. Quoiqu'il en soit, le mécanisme mis en jeu semble impliquer la présence de GSH extracellulaire et l'activité GGT.

Le carboplatine est un autre dérivé du platine qui a le même mode d'action, mais une pharmacocinétique différente car il s'hydrolyse moins rapidement pour donner la forme active. Nous avons mené les mêmes expériences pour ce composé, mais la cytotoxicité n'a été mesurée que 48 H après le début des traitements.

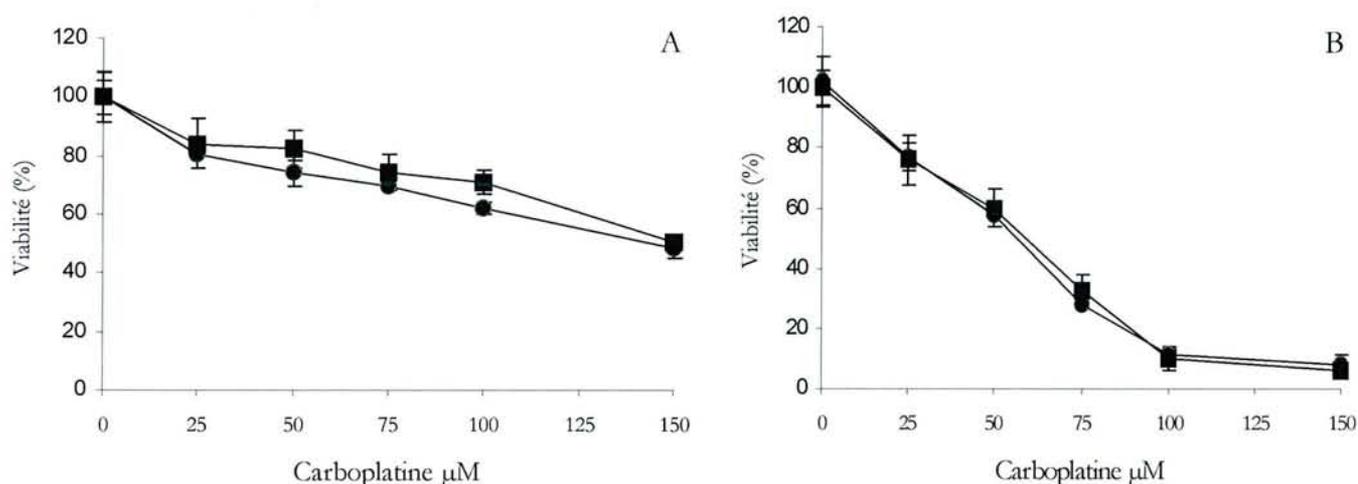


Figure 45 : Cytotoxicité du carboplatine. Les cellules HeLa (●) et HeLa-GGT (■) sont traitées 48 heures dans du milieu 250 μ M cys (A), 50 μ M cys (B) par différentes doses de carboplatine. Les résultats correspondent à la moyenne et à l'écart type calculés à partir de 8 essais.

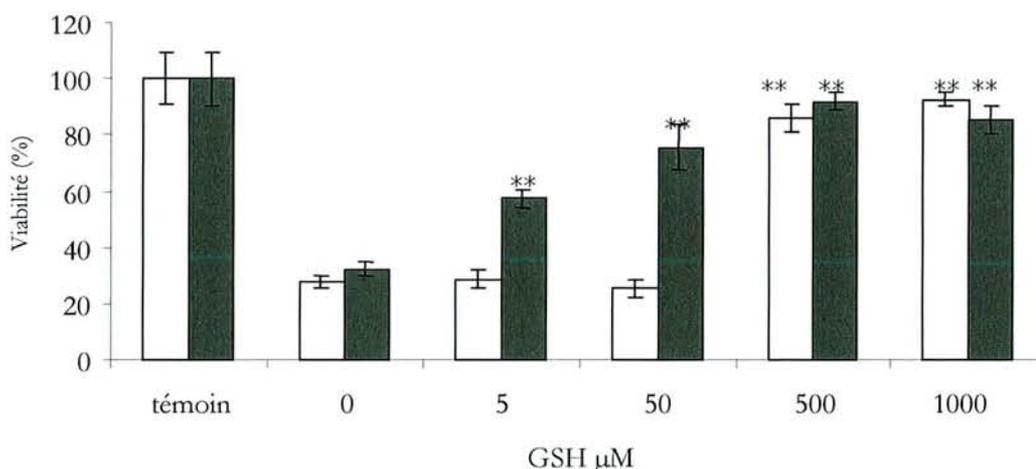
Dans le milieu contenant 250 μ M de cystine, l'IC₅₀ du carboplatine est le même pour les lignées HeLa et HeLa-GGT et environ 150 μ M (Figure 45 A). Par contre lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu contenant 50 μ M de cystine, (Figure 45 B), elles deviennent beaucoup

plus sensibles à cet agent ($IC_{50} \approx 60 \mu\text{M}$). Cependant, dans ces conditions l'activité GGT ne semble jouer aucun rôle sur la cytotoxicité du carboplatine.

Ainsi, dans le cas du carboplatine au contraire du CDDP, la concentration en GSH intracellulaire paraît être un facteur déterminant pour la défense cellulaire.

Afin de rechercher si la GGT peut avoir une implication dans la défense cellulaire au carboplatine, nous avons cultivé les cellules des deux lignées dans le milieu contenant $50 \mu\text{M}$ cystine et nous les avons traitées par $75 \mu\text{M}$ de carboplatine en présence de concentrations croissantes en GSH (Figure 46). La valeur du témoin (100 %) correspond à la viabilité des cellules dans le milieu contenant $250 \mu\text{M}$ de cystine.

Figure 46 : Influence du taux de GSH extracellulaire sur la cytotoxicité du



carboplatine pour les cellules HeLa (\square) et HeLa-GGT (\blacksquare). Les cellules HeLa et HeLa-GGT sontensemencées dans du milieu $250 \mu\text{M}$ cys (témoin) ou $50 \mu\text{M}$ cys contenant de 0, 5, 50, 500 ou 1000 μM de GSH et $75 \mu\text{M}$ de carboplatine. La viabilité est mesurée après 48 heures de traitement. La valeur 100 % correspond à la viabilité des cellules HeLa ou HeLa-GGT dans le milieu $250 \mu\text{M}$. Les résultats correspondent à la moyenne et à l'écart type calculés à partir de 8 essais. **: $p < 0.005$ par rapport à la même lignée traitée par $75 \mu\text{M}$ de carboplatine et sans GSH extracellulaire.

Comme nous pouvons l'observer dans la Figure 46 la viabilité des cellules HeLa-GGT est améliorée dès les faibles concentrations ($5 \mu\text{M}$) de GSH extracellulaire. En effet cette viabilité passe d'environ 25 % en absence de GSH à 60 % en présence de $5 \mu\text{M}$ du tripeptide et à 75% pour la concentration de $50 \mu\text{M}$. A la concentration de $500 \mu\text{M}$, les cellules sont même

entièrement protégées de l'effet cytotoxique du carboplatine et elles montrent la même viabilité que les cellules témoins.

En revanche, la viabilité des cellules HeLa, n'est pas améliorée aux concentrations de 5 et 50 μM de GSH. Cependant, lorsque celui-ci est fourni à de fortes concentrations (500 et 1000 μM) les cellules HeLa semblent être aussi protégées contre le carboplatine.

Nous pouvons expliquer ces résultats par la différence de contenu en GSH intracellulaire des cellules HeLa et HeLa-GGT lorsque ce tripeptide joue le rôle de fournisseur de cystéine (Tableau X). Grâce à la GGT les cellules dégradent le GSH et s'approvisionnent en cystéine qui est ensuite utilisée pour la synthèse du GSH intracellulaire. Les cellules HeLa-GGT ayant une forte activité GGT (~ 150 mU/mg protéine) peuvent dégrader plus rapidement le GSH du milieu, même à des faibles concentrations proches ou inférieures du K_m de l'enzyme. La concentration du GSH intracellulaire de ces cellules est alors augmentée et elles résistent mieux au traitement que les cellules HeLa.

Cependant, lorsque le GSH est fourni aux cellules à de fortes concentrations, la différence du niveau d'expression de l'enzyme ne semble plus être un facteur limitant puisque les deux lignées montrent une viabilité comparable et équivalente à celle trouvée dans le milieu contenant 250 μM de cystine.

D'après nos résultats, il apparaît clairement que le GSH intracellulaire est corrélé à la résistance au carboplatine, alors que les mécanismes de réponse au CDDP sont différents. Toutefois, la surexpression de la GGT entraîne une résistance accrue à ces deux agents lorsque du GSH extracellulaire est présent. La plus grande résistance au carboplatine peut être expliquée par la restauration du GSH intracellulaire plus rapide pour les cellules surexprimant la GGT. Par contre, pour le CDDP, la concentration en GSH cellulaire n'est pas un facteur déterminant pour la défense cellulaire contre cet anticancéreux. Donc, la plus grande résistance cellules HeLa-GGT en présence de GSH doit s'expliquer par un autre mécanisme.

2.5.2. La résistance des cellules HeLa-GGT au CDDP : un mécanisme extracellulaire ?

Nous avons montré que le taux de GSH intracellulaire ne modifie pas la viabilité des cellules HeLa en présence de CDDP. Cependant, en présence de GSH extracellulaire, les cellules HeLa-GGT apparaissent plus résistantes aux doses 2,5 et 5 μM de CDDP. Le mécanisme mis en jeu semble impliquer l'activité catalytique de la GGT ainsi que la présence de GSH extracellulaire. Comme nous l'avons montré précédemment (Figure 43), les cellules HeLa-GGT en présence de GSH extracellulaire produisent des quantités importantes de la CysGly. Il est maintenant bien établi qu'en présence de métaux de transition le catabolisme du GSH conduit à la production d'ERO (Drodz et al, 1998). Ceci est démontré dans la Figure 47 : les cellules HeLa et HeLa-GGT ont été incubées en présence de GSH et d'une source de fer et la production d'ERO a été évaluée par l'oxydation de la DHR-123 en Rh-123. Comme nous l'attendions, les cellules HeLa-GGT, à cause de leur activité GGT élevée, produisent 2,3 fois plus d'ERO que les cellules HeLa. Lorsque les mêmes expériences ont été réalisées en présence de CDDP, la production d'ERO a été inhibée de 92 % pour les cellules HeLa, et de 62 % pour les cellules HeLa-GGT.

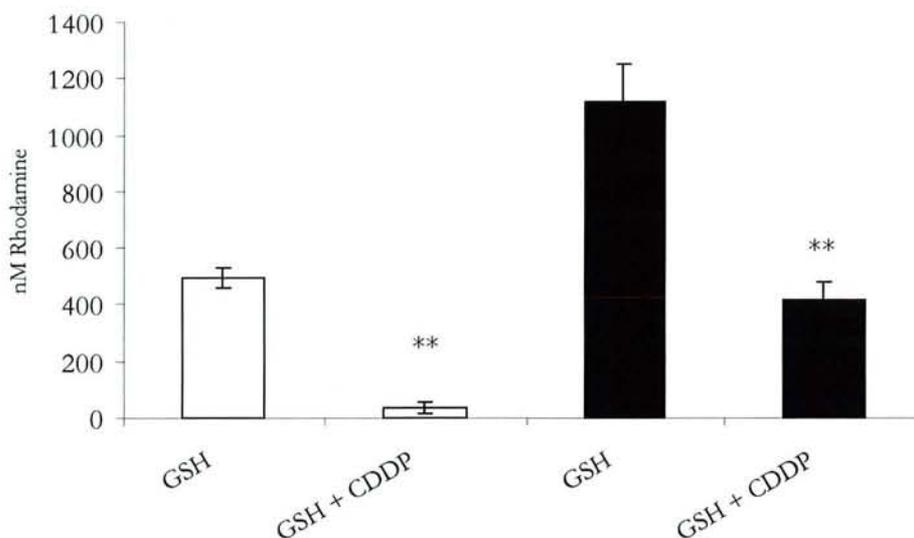


Figure 47 : Mesure de la production d'ERO par les lignées HeLa et HeLa-GGT. Les cellules HeLa (\square) et HeLa-GGT (\blacksquare) sont ensemencées en plaques de 6 puits et incubées pendant 60 min dans du PBS contenant 160 μM Fe, 100 μM EDTA, 1 mM de GSH et 25 μM de DHR-123 avec ou sans 100 μM de CDDP. Le milieu extracellulaire est utilisé pour le dosage de la production d'ERO. Parallèlement, des blancs sont effectués sans cellules, et les valeurs obtenues sont soustraites aux valeurs des essais. **: $p < 0.005$ par rapport à la production d'ERO de la même lignée cellulaire sans CDDP.

Pour quelle raison le CDDP inhiberait-il la production des ERO ?

La production des ERO par le catabolisme du GSH dépendant de la GGT est due à la très haute réactivité du groupement thiol de la CysGly. Il est aussi bien connu que le CDDP forme spontanément des adduits avec le GSH en réagissant avec son groupement thiol (Bernareggi *et al*, 1995). Donc, l'inhibition de la production d'ERO par le CDDP serait due à la réaction de celui-ci soit avec le groupement thiol du GSH, soit avec celui de la CysGly.

Nous avons vérifié cette hypothèse en mesurant la vitesse de formation *in vitro* des adduits entre le GSH ou la CysGly et le CDDP. Nous avons donc développé un système CLHP permettant de mettre en évidence ces adduits et de les quantifier (matériel et méthodes section 3.7.1). La quantification se fait en considérant que l'absorption de l'adduit est principalement due à celle du thiol qui le compose. Les résultats sont représentés dans la Figure 48.

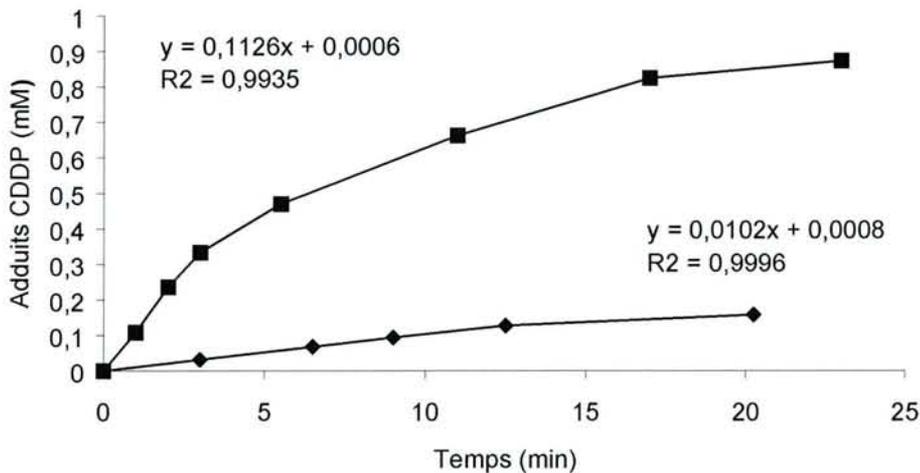


Figure 48 : Cinétique d'apparition des adduits GSH-CDDP (◆) et CysGly-CDDP (■) *in vitro*. 1 mM de GSH a été incubé avec 10 mM de GSH ou de CysGly dans du tampon phosphate pH 7,4 à 37°C. Des échantillons ont été prélevés à différents temps et les adduits au CDDP ont été dosés par CLPH. Les équations sont dérivées des parties linéaires : de 0 à 6 minutes pour l'adduit GSH-CDDP, et de 0 à 15 minutes pour l'adduit CysGly-CDDP.

Nous avons choisi de travailler dans des temps courts pour mesurer la formation d'un seul type d'adduit. En effet, dans les temps plus long, d'autres sortes d'adduits de stœchiométrie différentes

apparaissent et les profils chromatographiques deviennent particulièrement complexes (Heudi *et al.*, 1999). La formation de l'adduit CysGly-CDDP atteint très rapidement un plateau alors que la production de l'adduit GSH-CDDP reste linéaire pendant 15 min. La vitesse de formation des adduits CysGly-CDDP calculée sur la partie linéaire de la courbe est de 0,1126 $\mu\text{mol/ml/min}$, 10 fois supérieure à la vitesse de formation de l'adduit GSH-CDDP (0,0102 $\mu\text{mol/ml/min}$). Nous avons donc démontré que la CysGly peut former des adduits avec le CDDP. Les différences de la vitesse de formation des adduits peut s'expliquer par la plus haute réactivité du groupement thiol de la CysGly au pH physiologique.

Pour vérifier ensuite que la formation de l'adduit CysGly-CDDP est lié à l'activité catalytique de la GGT, nous avons incubé du GSH et du CDDP en présence d'une source de GGT (purifiée à partir des cellules HeLa-GGT).

Par CLHP, nous avons suivi en fonction du temps la disparition du GSH, l'apparition de la CysGly, l'apparition de l'adduit CysGly-CDDP, et de la CysGly oxydée (GCCG). Le système CLHP diffère de celui utilisé pour mesurer les cinétiques de formation des différents adduits *in vitro* par l'utilisation d'un contre ion qui permet de séparer l'adduit CysGly-CDDP du CDDP, du GSH et de la CysGly. Cependant, ce système ne permet pas de détecter l'éventuelle formation de l'adduit GSH-CDDP.

Les résultats sont présentés dans la Figure 49.

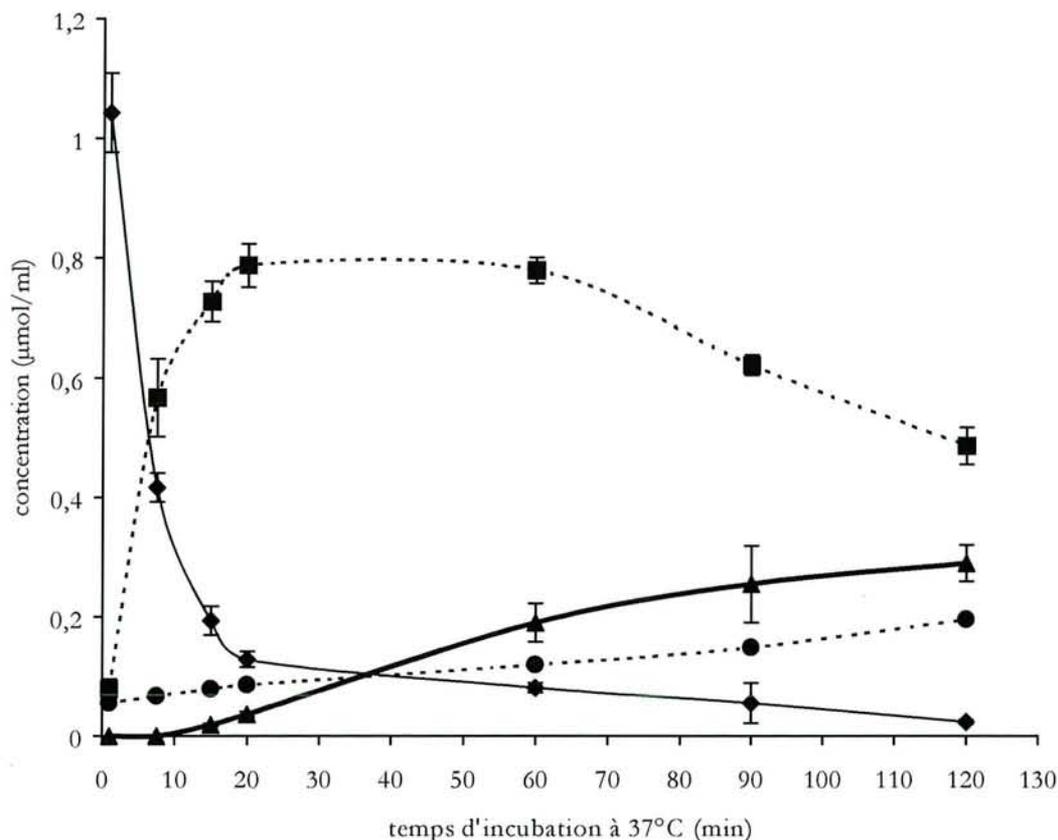


Figure 49 : Apparition de l'adduit CysGly-CDDP en présence de GGT purifiée. 1 μ mole de GSH, 0,5 μ mole CDDP et 50 mU de GGT sont incubés dans 1 ml de tampon 10 mM phosphate pH 7,4, 150 mM NaCl et incubés à 37 °C pendant différents temps (de 0 à 120 min). Les essais sont réalisés en triple et injectés dans les système CLHP (matériel et méthodes section 3.7.3) pour suivre la consommation du GSH (◆), l'apparition de la CysGly (■), l'apparition de la CysGly oxydée (●) et de l'adduit CysGly-CDDP (□).

Le GSH présent à la concentration de 1 mM au temps 0 disparaît rapidement les 20 premières minutes, puis plus lentement jusqu'à 120 minutes où il devient pratiquement indétectable.

En parallèle, l'apparition de la CysGly (produit de dégradation du GSH par la GGT purifiée) est linéaire pendant environ 20 minutes avant d'atteindre un plateau. A partir de 60 min et jusqu'à 120 min, la quantité de CysGly diminue. Cette diminution est corrélée avec l'apparition linéaire de la forme oxydée du dipeptide (GCCG) et avec l'apparition linéaire de l'adduit CysGly-CDDP.

Dans ces conditions, l'adduit GSH-CDDP n'est pas détectable, car il est probablement produit à de très faibles quantités. Par cette expérience, nous montrons clairement que le catabolisme du GSH par la GGT et en présence de CDDP conduit à la formation de l'adduit CysGly-CDDP.

D'autre part, cette expérience peut permettre de calculer la stœchiométrie théorique de l'adduit CysGly-CDDP.

En effet, entre les temps d'incubation 20 et 120 min :

- La consommation totale de CysGly est d'environ 0,3 mM
- La consommation de CDDP est d'environ 0,19 mM (résultats non montrés sur la figure 49)
- La production de la forme oxydée de la CysGly est de 0,1 mM (soit équivalente à la consommation de 0,2 mM de CysGly).

En théorie, il reste donc pour la formation de l'adduit CysGly-CDDP, 0,1 mM de CysGly, consommée simultanément avec 0,19 mM de CDDP, soit une consommation de CDDP deux fois supérieure à celle de la CysGly dans le même temps de réaction. L'adduit mesuré aurait donc la stœchiométrie 1:2 (CDDP : CysGly). Ces résultats ne sont qu'une approche de la stœchiométrie de l'adduit CysGly-CDDP, sans technique d'analyse structurale les confirmant, ceux-ci restent des hypothèses.

Si la formation de cet adduit intervient dans la résistance cellulaire au CDDP, il faut alors vérifier qu'il se forme en présence des cellules HeLa-GGT et non en présence des cellules HeLa. Les cellules HeLa et HeLa-GGT ont été alors incubées dans du PBS contenant 1 mM de GSH, 5 mM de GlyGly, et 100 μ M de CDDP. Nous avons été obligés d'incuber les cellules dans du PBS car la composition complexe du milieu de culture interfère sur la séparation et l'identification des composés. Nous avons également été obligés d'augmenter les quantités de CDDP et de GSH lors de ces incubations à cause du seuil de sensibilité du système de CLHP qui ne permet pas de détecter de trop faibles concentrations d'adduits.

La Figure 50 présente les chromatogrammes obtenus aux temps d'incubation 0 (Figure 50 A), et 100 min pour les cellules HeLa-GGT (Figure 50 B), et HeLa (Figure 50 C).

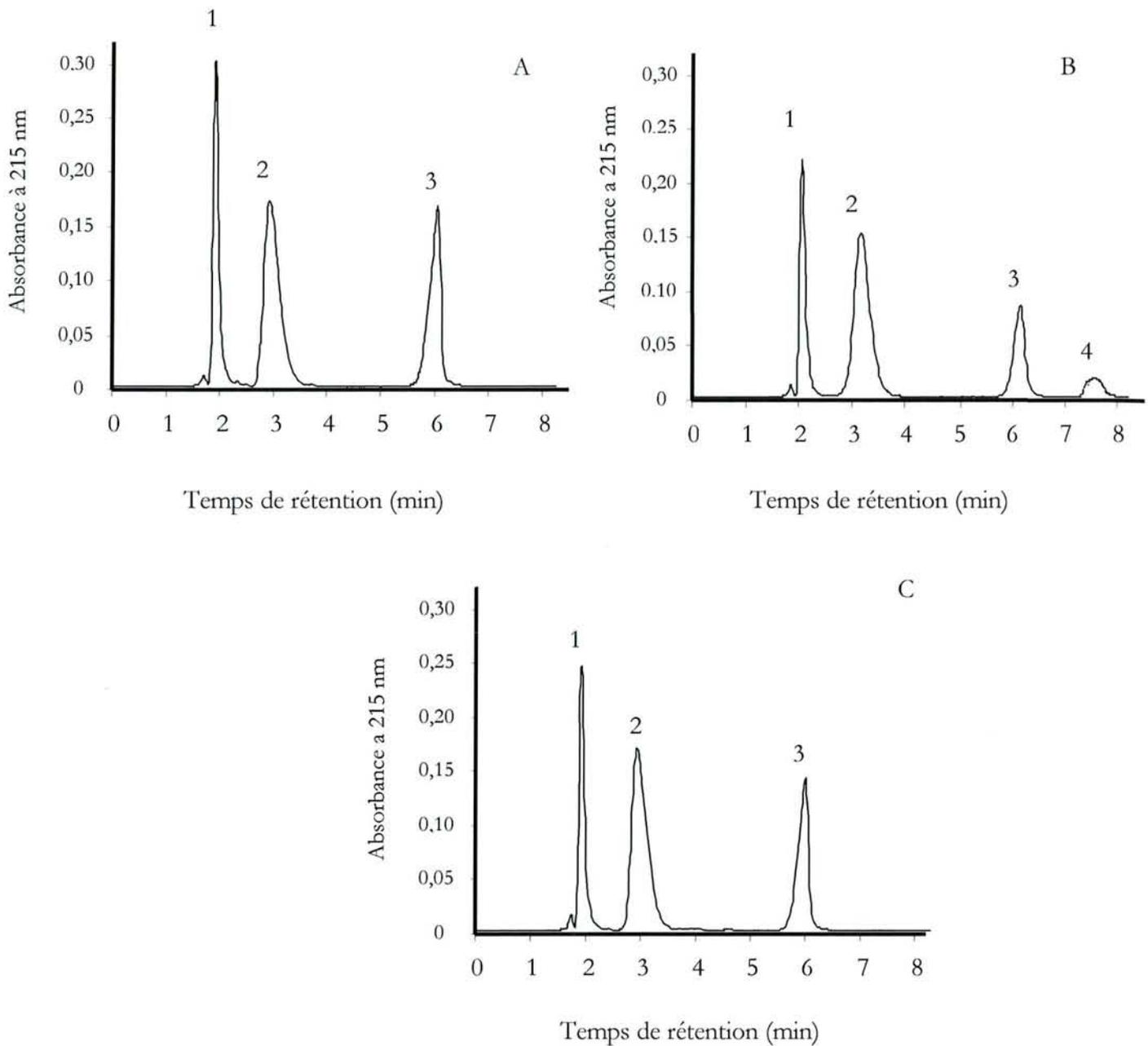


Figure 50 : Formation de l'adduit CysGly-CDDP dans le milieu extracellulaire. Les cellules sont incubées dans du PBS contenant 1 mM de GSH, 5 mM de GlyGly, et 100 μ M de CDDP. Le milieu extracellulaire est alors prélevé pour l'analyse par HPLC aux temps 0 (AA), et 100 min pour les cellules HeLa-GGT (AB) et HeLa (AC). Les temps de rétention sont respectivement : 2, ; 3 ; 3,3 ; 5,58 ; 6 ; et 7,8 pour le CDDP (1), la GlyGly et l'adduit CDDP-GSH (2), le GSH et la CysGly (3) et l'adduit CysGly-CDDP (4).

Nous pouvons constater que l'adduit CysGly-CDDP ne se forme que dans le milieu d'incubation des cellules HeLa-GGT. Cette formation peut être liée à la diminution de l'air du pic correspondant au CDDP.

Afin d'expliquer la plus grande résistance des cellules HeLa-GGT au CDDP lorsque du GSH extracellulaire est fourni aux cellules, nous nous sommes intéressés aux mécanismes extracellulaires et nous avons montré :

- ✓ Que les cellules qui expriment plus fortement la GGT métabolisent le GSH extracellulaire et produisent de la CysGly de façon plus rapide que la lignée parentale HeLa.
- ✓ Que le stress oxydant généré par la CysGly en présence d'une source de fer est inhibé par la présence de CDDP, ce qui suggère que cet agent peut interagir avec le groupement thiol de la CysGly.
- ✓ Que la CysGly forme des adduits avec le CDDP, et ce beaucoup plus rapidement que le GSH.
- ✓ Que l'activité catalytique de la GGT est responsable de la formation de l'adduit CysGly-CDDP en présence de GSH et que l'adduit CysGly-CDDP est détecté dans le milieu extracellulaire des cellules à forte activité GGT.

Ainsi, outre son rôle primordiale dans la synthèse et le renouvellement du GSH, nos résultats suggèrent que la GGT pourrait également intervenir dans la résistance au CDDP via un autre mécanisme. Ce mécanisme impliquerait la formation d'adduits CysGly-CDDP au niveau extracellulaire, ce qui diminuerait la cytotoxicité du composé, ou sa disponibilité. Si ce mécanisme est démontré *in vivo* (modèles animaux), il pourrait être l'un des facteurs déterminant l'échec ou la réussite du traitement. En effet, l'induction de la GGT est un événement de réponse précoce au CDDP pour la lignée HeLa. Ensuite, en présence d'une faible concentration en GSH et en CDDP (50 et 5 μM respectivement correspondant à peu près aux taux plasmatiques après un traitement), les cellules exprimant la GGT disposeront d'un système de défense intervenant avant même que l'agent antitumoral ne pénètre dans la cellule.

DISCUSSION 2^{ème} **PARTIE**

L'activité GGT est souvent augmentée dans les lignées cellulaires cancéreuses par rapport aux cellules saines. Les mécanismes et la nécessité de cette induction sont inconnus. Par exemple, Hanigan *et al* (1994), ont montré que les cellules issues de cancer ovarien présentent souvent une forte expression de cette enzyme. Vincenzini *et al* (1993), ont montré que des cellules de fibroblastes NIH3T3 transfectées par les oncogènes *erb B*, *raf* ou *src* voyaient leur taux de GSH intracellulaire augmenté parallèlement à l'induction de la γ GCS. Bien que les auteurs n'aient pas étudié la régulation de la GGT dans ces cellules, plusieurs études ont montré que la GGT est induite par l'oncogène *ras* (Sinha *et al*, 1987, Ly *et al*, 1988). L'induction des oncogènes pourrait être en cause dans l'augmentation de l'expression de la GGT lors de la cancérogénèse.

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet d'une surexpression de la GGT sur la prolifération cellulaire et sur la réponse cellulaire aux anticancéreux.

Obrador *et al* (2002) ont démontré que des cellules de mélanomes transfectées par le gène de la GGT sont capables de proliférer et de générer des métastases dans le foie de souris nues. En 1995, Hanigan démontrait que des tumeurs exprimant la GGT prolifèrent plus vite car elles possèdent un avantage par rapport aux tumeurs pauvres en GGT pour leur approvisionnement en cystéine. En effet, *in vivo*, les concentrations en cys circulante sont faibles mais les cellules exprimant la GGT à la surface de leur membrane peuvent utiliser le GSH circulant comme source de cystéine. Les mêmes auteurs ont démontré que non seulement les tumeurs exprimant fortement la GGT prolifèrent plus vite, mais qu'en plus elles acquièrent une plus grande résistance au CDDP *in vivo* (Hanigan *et al*, 1999).

La résistance des cellules tumorales est un frein à l'utilisation chimiothérapeutique du CDDP. De nombreuses études utilisant des lignées rendues résistantes à cet anticancéreux ont permis de comprendre quels systèmes de défense les cellules peuvent utiliser contre le CDDP. Ils sont très nombreux (cf introduction), et donc la résistance est le plus souvent multifactorielle et donc très difficile à prédire et à contrecarrer. En parallèle, plusieurs dérivés du platine comme le carboplatine sont apparus dans l'arsenal thérapeutique, mais le CDDP reste l'un des médicaments les plus utilisés contre de nombreuses tumeurs solides.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la place de la GGT et du GSH dans la réponse cellulaire au CDDP et au carboplatine.

Nous avons tout d'abord montré qu'une des réponses rapides des cellules HeLa à une exposition au CDDP est l'augmentation de l'activité GGT (de 3 fois après 48 heures d'exposition à 2,5 μM de CDDP). Cette augmentation de l'activité est corrélée à l'accumulation de l'ARNm I_T. Godwin *et al* (1992) ont aussi montré une corrélation entre le degré de résistance au CDDP de cellules ovariennes et le taux du messager de la GGT, d'ailleurs l'ARNm de la GGT est induit plus rapidement que celui de la γGCS en réponse au CDDP. Néanmoins cette l'étude portait sur des lignées sélectionnées par des exposition répétées à l'agent. Oguchi *et al* (1994) ont démontré que le traitement au CDDP de deux lignées cellulaires ovariennes, l'une sensible et l'autre résistante, résultait en une induction du messager de la GGT deux fois plus importante pour la lignée résistante. El-Akawi *et al*, (1996) ont montré que une seule exposition de cellules ovariennes au CDDP conduit à une augmentation de l'activité GGT, de l'ARNm correspondant et du GSH intracellulaire, mais ils n'ont pas détecté d'augmentation de l'ARNm de la γGCS .

Aucune donnée n'existe sur la régulation de l'expression de la GGT par le carboplatine, mais nous avons montré que cet agent est également responsable d'une augmentation de l'activité de l'enzyme dans la lignée HeLa. Nous avons choisi d'effectuer des traitements par le carboplatine pendant 48 heures car cet agent est plus stable et la forme active résultant de son hydrolyse apparaît plus lentement que celle du CDDP.

Les mécanismes responsables d'une augmentation de la synthèse de la GGT sont difficiles à expliquer. Le CDDP peut induire *cfos* et *cjun* (Kartalou *et al*, 2001) et l'induction de la transcription pourrait être liée à une voie impliquant AP1. Dans plusieurs lignées cancéreuses humaines, le CDDP induit l'expression des deux sous unités de la γGCS de façon simultanée, et cette induction est liée au site AP1 proximal du promoteur (Iida *et al*, 1999). Dans la lignée HeLa, l'augmentation du taux de l'ARNm total de la GGT est liée à l'induction des deux sous types majoritaires dans cette lignée: l'ARNm I_A et l'ARNm I_C. Or, nous avons montré dans la première partie de notre étude que le promoteur C possède 3 sites potentiels pour la fixation du facteur AP1 qui pourraient donc être responsables de l'induction de l'enzyme par le CDDP.

Le contenu intracellulaire en GSH est souvent augmenté dans les cellules résistantes au CDDP (Godwin *et al*, 1992, Newkirk *et al*, 1996) puisqu'elles peuvent détoxifier cet agent en formant des adduits GSH-CDDP qui sont exportés en dehors de la cellule via la pompe GS-X (Goto *et al*, 1995). Une déplétion du GSH intracellulaire des lignées résistantes peut parfois restaurer leur sensibilité au CDDP (Nagata *et al* 2001). Cependant, Meijer *et al*, (1992) ont montré que l'utilisation du BSO (inhibiteur de la γ GCS) à un effet dépendant de la lignée cellulaire et du dérivé au CDDP étudié.

Dans nos lignées cellulaires, une seule exposition au CDDP ou au carboplatine entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en GSH (d'environ 25 % pour le CDDP en 24 heures et 33 % pour le carboplatine en 48 heures).

Ainsi, dans la lignée HeLa, l'une des réponses rapides à un traitement par le CDDP ou le carboplatine résulte en une augmentation de l'activité GGT et du contenu intracellulaire en GSH.

En utilisant nos lignées modèles HeLa et HeLa-GGT (possédant une activité GGT de 10 et 150 mU/mg de protéines respectivement), nous avons étudié l'effet d'une surexpression de la GGT sur la régulation du contenu en GSH intracellulaire dans différentes conditions de culture pendant 24 ou 48 heures. (Tableau X)

Le milieu de culture classique (DMEM 250 μ M cys) est un milieu riche qui contient tous les acides aminés précurseurs du GSH et ce genre de milieu est utilisé dans la grande majorité des études *in vitro*. Dans ces conditions de culture, le contenu intracellulaire en GSH est le même pour les deux lignées cellulaires (environ 38 nmol/mg de protéines et 30 nmol/mg de protéines aux temps 24 et 48 heures respectivement).

Nous avons également travaillé dans un DMEM contenant 50 μ M de cys (correspondant à la concentration plasmatique de cet acide aminé). Dans ces conditions plus proches des conditions «physiologiques», nous observons une diminution spectaculaire et rapide du contenu intracellulaire (environ 90 % dès 24 heures) pour les deux lignées cellulaires. Ce résultat montre que les cellules HeLa-GGT ne possèdent pas d'avantage pour le maintien de leur pool de GSH intracellulaire lorsque l'acide aminé essentiel à la synthèse du tripeptide est fourni à de faibles

concentrations. Malgré cette déplétion, les cellules gardent une viabilité comparable à celle observée dans le milieu DMEM 250 μM . L'utilisation de ce milieu pour l'étude de l'effet d'une déplétion du GSH intracellulaire sur la cytotoxicité des dérivés du platine est un outil de choix. En effet, le BSO entraîne une diminution du GSH intracellulaire en inhibant la γGCS et interfère donc sur les voies métaboliques et probablement sur les voies de transduction du signal. De plus, Kang *et al*, (1991) ont clairement démontré que des cellules A549 de cancer du poumon traitées par le BSO présentent un taux de croissance diminué lié à une diminution de la synthèse protéique et de l'ADN plutôt qu'à la diminution du GSH intracellulaire.

Lorsque du GSH (50 μM) est ajouté au milieu 50 μM cys, les cellules HeLa, possédant une activité GGT faible sont capables d'augmenter progressivement leur contenu en GSH intracellulaire : elles passent de $2,2 \pm 0,6$ à $6 \pm 1,2$ nmol/mg de protéines en 24 heures, puis à $12,9 \pm 1,0$ nmol/mg de protéines après 48 heures.

Pour les cellules HeLa-GGT, la restauration du GSH intracellulaire est plus rapide puisqu'elles reconstituent plus de 50 % de leur pool en 24 heures (de $2,7 \pm 0,5$ à $19,1 \pm 3,0$ nmol/mg de protéines). Par contre, après 48 heures de culture, le contenu en GSH diminue pour atteindre un taux comparable à celui des cellules HeLa ($9,5 \pm 1,2$ nmol/mg de protéines).

Ces conditions de culture sont celles se rapprochant le plus des conditions physiologiques car le sérum humain contient environ 50 μM de cystine, et le GSH circulant peut être utilisé par les cellules exprimant la GGT.

Nous avons donc montré qu'une surexpression de la GGT ne confère un avantage pour la synthèse intracellulaire du GSH que lorsqu'une source extracellulaire du tripeptide est fournie comme source de cystéine.

Ces données sont en accord avec l'étude de Saint Vincent *et al*, (1999) qui démontrent que l'étape limitante de la biosynthèse du GSH n'est pas l'activité γGCS , mais la disponibilité en cystéine.

Après avoir montré l'effet d'une surexpression de la GGT sur le contenu intracellulaire en GSH, nous avons réalisé des mesures de cytotoxicité pour le CDDP et le carboplatine dans les différentes conditions de culture.

Pour le carboplatine, les mesures de cytotoxicité sont réalisées après 48 heures de traitement par des doses allant de 0 à 150 μM (Figure 45). Les résultats montrent que dans le milieu DMEM 250 μM cys, l'IC 50 est le même pour les lignées HeLa et HeLa-GGT (environ 150 μM). Par contre, lorsque les cellules sont traitées dans le milieu DMEM 50 μM cys, elles deviennent beaucoup plus sensibles au carboplatine (IC 50 environ égal à 60 μM pour les deux lignées).

Dans ces conditions, le niveau d'expression de la GGT n'influe pas sur la réponse cellulaire au carboplatine. Par contre, le taux de GSH intracellulaire semble être directement impliqué dans la sensibilité des cellules à l'agent puisque dans le milieu DMEM 50 μM leur taux de GSH est très largement diminué parallèlement à l'augmentation de leur sensibilité.

Bien que de nombreuses données existent sur le rôle du GSH intracellulaire dans la résistance au CDDP, les études concernant le carboplatine sont plus rares et assez contradictoires. Par exemple, Pendyala *et al*, (1995) n'ont trouvé aucune corrélation entre la concentration en GSH de 10 lignées cellulaires humaines et la cytotoxicité de différents dérivés du platine. Cependant, cette étude ne tenait pas compte des nombreux autres paramètres pouvant entrer dans les mécanismes de résistance aux dérivés du platine ni des différences entre les lignées étudiées. Une déplétion du GSH intracellulaire des cellules de cancer du poumon résistantes au CDDP et présentant une résistance croisée pour le carboplatine par l'utilisation de BSO restaure la sensibilité au carboplatine (l'IC 50 est diminuée de 2 fois) (Mijer *et al*, 1992). L'étude de lignées cellulaires établies à partir de tumeurs humaines avant ou après traitement des patients, a également montré une corrélation entre le contenu intracellulaire en GSH et l'IC50 obtenue après traitement de ces cellules au CDDP ou au carboplatine suggérant que les tumeurs riches en GSH résistent mieux à ces agents anticancéreux (Mistry *et al*, 1991). Cependant, il a été également montré qu'une déplétion du GSH par le BSO dans une lignée de cancer ovarien ne modifiait pas significativement sa réponse au carboplatine (Andrews *et al*, 1985).

Nous avons donc testé l'influence de la concentration extracellulaire en GSH sur le cytotoxicité du carboplatine (Figure 46), et nous avons clairement démontré que les cellules HeLa-GGT possèdent un avantage lorsque du GSH est présent en faible concentration (5 et 50 μM). Leur viabilité est augmentée (de 25% à 60 % pour la concentration 5 μM et de 25% à 75% pour la concentration 50 μM) alors que celle des cellules HeLa reste comparable à la viabilité mesurée

sans GSH extracellulaire. La plus grande résistance des cellules HeLa-GGT provient du fait qu'elles utilisent plus rapidement le GSH extracellulaire comme source de cystéine pour la synthèse intracellulaire du tripeptide. La résistance est proportionnelle à la concentration en GSH extracellulaire fourni pour les cellules HeLa-GGT, et pour des concentrations supérieures à 50 μM (à partir de 500 μM), la viabilité de ces cellules devient identique à celle trouvée pour les cellules non traitées.

Pour les cellules HeLa, l'effet protecteur du GSH extracellulaire n'est effectif qu'à partir des fortes concentrations (500 μM et 1mM).

Nos résultats montrent que le contenu en GSH intracellulaire est un facteur primordial dans la réponse des cellules HeLa au carboplatine car une déplétion du tripeptide sensibilise les cellules à cet agent.

La surexpression de la GGT entraîne une résistance accrue au carboplatine lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu appauvri en cys en présence de faibles concentrations en GSH, c'est à dire dans les conditions proches des concentrations plasmatiques en ces deux composés (environ 50 μM de cystine et 5 μM de GSH). Cette résistance accrue s'explique par l'avantage que les cellules HeLa-GGT ont pour augmenter la synthèse *de novo* du GSH intracellulaire en utilisant le tripeptide extracellulaire.

Dans la plupart des études sur les résistances liées à une augmentation du GSH intracellulaire, les auteurs s'intéressent au rôle de la γGCS , et omettent le rôle crucial de la GGT dans l'approvisionnement des cellules en cys. Nos résultats montrent que ce paramètre est probablement au moins aussi important que la régulation de la γGCS . Par exemple, Newkirk *et al*, (1997) ont montré que le GSH intracellulaire et non l'expression de la γGCS est un facteur déterminant pour l'IC 50 du CDDP dans des cellules de cancer de la tête et du cou. Peut être les 3 paramètres (GSH intracellulaire, expression de la γGCS et l'expression de la GGT) devraient ils être pris en considération lors des études sur la résistance au CDDP.

Nous avons mené les mêmes expériences pour étudier la cytotoxicité du CDDP dans les différentes conditions de culture, et nous avons montré que l'IC 50 du CDDP ne dépend pas du contenu en GSH des cellules HeLa et HeLa-GGT. En effet, les courbes de cytotoxicité ne diffèrent pas significativement entre les deux milieux DMEM 50 et DMEM 250 μM (Figure 44).

Bien que la plupart des études rapportent une augmentation de la cytotoxicité du CDDP lorsque le GSH intracellulaire est diminué, Pendyala *et al* (1997) ont travaillé sur des cellules de mélanomes qui n'étaient que peu affectées par une déplétion du GSH par le BSO. Cependant il est important de rappeler que les expériences *in vitro* sur l'influence du GSH intracellulaire sont généralement réalisées en utilisant du BSO. Ainsi, les cellules ont un faible taux de GSH, mais elles ne peuvent pas non plus renouveler ce faible pool en réponse à un traitement au CDDP. Dans nos conditions, la γ GCS est active et peut restaurer le GSH consommé par le CDDP.

Lorsque les cellules sont traitées au CDDP en présence de 50 μ M de GSH, nous avons mis en évidence une résistance accrue des cellules HeLa-GGT pour les plus faibles doses (2,5 et 5 μ M). Une hypothèse pour expliquer ce résultat est que les cellules HeLa-GGT peuvent cataboliser le GSH extracellulaire plus rapidement en fournissant ainsi à la cellule les précurseurs nécessaires à un meilleur renouvellement du pool intracellulaire et donc à une meilleure détoxification du CDDP. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hanigan *et al*, (1995) qui ont montré que *in vivo* des tumeurs exprimant la GGT possèdent un avantage pour leur prolifération et sont plus résistantes au CDDP alors que leur taux de GSH intracellulaire est le même que les cellules parentales pauvres en GGT.

Cependant, cette explication n'est pas entièrement satisfaisant pour notre modèle puisque l'IC 50 dans les deux milieux est le même alors que dans le milieu 250 μ M cys, les cellules peuvent renouveler leur pool de façon rapide et devraient donc être plus résistantes.

Nous avons alors recherché par quel mécanisme les cellules HeLa-GGT résistent mieux aux faibles doses de CDDP lorsque du GSH extracellulaire est présent.

Le catabolisme du GSH par la GGT est accompagné de la production de CysGly, un thiol très réactif dans le milieu extracellulaire. En présence d'un métal de transition, ce dipeptide conduit à la formation d'ERO (Drozd *et al*, 1998). Nous avons montré que les cellules HeLa et HeLa-GGT en présence de GSH peuvent produire des ERO dans le milieu extracellulaire, cependant, la production d'ERO est liée au degré d'expression de la GGT : en 60 min, les cellules HeLa-GGT produisent 2 fois plus d'ERO que la lignée parentale HeLa. Cette différence s'explique par le taux de consommation supérieur du GSH par les cellules exprimant fortement la GGT (Figure

43). Pour les deux lignées cellulaires, la présence de CDDP dans le milieu d'incubation inhibe partiellement la formation des ERO.

Il est alors logique de penser que le CDDP peut former des adduits avec le groupement thiol de la CysGly qui est d'ailleurs plus réactif que celui du GSH. En accord avec cette hypothèse, nous avons mesuré *in vitro* les cinétiques de formations de l'adduit entre le GSH et le CDDP (adduit GSH-CDDP) et entre la CysGly et le CDDP (adduit CysGly-CDDP), et nous avons montré que la CysGly pouvait former des adduits avec le CDDP 10 fois plus vite que le GSH (Figure 48).

Afin de vérifier que l'activité catalytique de la GGT est responsable de la formation de cet adduit, nous avons démontré que le GSH est consommé par la GGT pour former de la CysGly qui réagit alors avec le CDDP pour former l'adduit CysGly-CDDP.

Nous avons donc montré l'existence d'un adduit formé de CDDP et du dipeptide CysGly, et nous avons prouvé qu'en présence de GSH et de CDDP, l'activité catalytique de la GGT permettait la formation de ces adduits.

Si la formation de ces adduits est impliquée dans la plus grande résistance des cellules HeLa-GGT, nous devrions pouvoir les détecter dans le milieu extracellulaire. Nous avons alors analysé la composition du milieu extracellulaire quand les cellules sont en présence de GSH et de CDDP (Figure 50) et nous avons clairement mis en évidence que l'adduit CysGly-CDDP est présent uniquement dans le milieu des cellules exprimant fortement la GGT.

Ainsi, la formation d'un adduit entre la CysGly produite par le métabolisme du GSH pourrait expliquer la plus grande résistance des cellules HeLa aux faibles doses de CDDP. Ce mécanisme ne semble cependant pas capable de diminuer l'effet cytotoxique du CDDP lorsqu'il est utilisé à des doses supérieures à 5 μM . Cependant, il est aussi important de noter que les concentrations de CDDP utilisées dans ce travail se rapprochent des concentrations détectées dans le sang pendant un traitement. Par exemple, Riva *et al* (2000) ont mesuré une concentration maximale de 4 μM de CDDP chez des patients participant à une étude clinique de phase II.

L'interaction du CDDP avec les molécules contenant un atome de soufre est bien connue. Il peut par exemple former avec le GSH différents types d'adduits impliqués dans la détoxification du CDDP (Arner *et al*, 2001, Bernareggi *et al*, 1995). Le CDDP peut également réagir avec le groupement thiol de la cystéine et de la méthionine pour former des adduits (Heudi *et al*, 2001).

Dans notre modèle expérimental, l'induction de la GGT et la modulation de la résistance des cellules HeLa à la cytotoxicité du CDDP (suite à cette augmentation de l'activité GGT) peuvent donc théoriquement se reproduire *in vivo*.

Nous proposons que la résistance au CDDP soit liée au moins en partie à un mécanisme dont la première étape aurait lieu au niveau extracellulaire : le clivage du GSH par la GGT produit de la CysGly qui peut alors former rapidement des adduits avec le CDDP et détoxifier le médicament en diminuant soit la réactivité soit la disponibilité de l'agent.

L'hypothèse que nous apportons est nouvelle, mais elle est en accord avec les travaux récents publiés par Paolicchi *et al* (2001), qui ont travaillé sur des lignées de mélanomes exprimant la GGT à différents degrés. Ils ont étudié la balance entre le milieu intracellulaire et extracellulaire pour le contenu et le statut redox de différents thiols et ont montré que le degré d'expression de la GGT modifie la composition du milieu extracellulaire : en effet, leur milieu extracellulaire est plus pauvre en GSH, GSSG et GluCys car les cellules consomment le GSH. Dans ces conditions, elles sont plus sensibles que les cellules exprimant plus faiblement la GGT. Par contre, les auteurs n'ont pas traité les cellules en présence de GSH extracellulaire et en plus, ils ont travaillé dans un milieu DMEM classique contenant 250 μ M de cys. Ces résultats montrent bien que la composition en thiols du milieu extracellulaire pourrait jouer un rôle dans la réponse au CDDP au même titre que le statut intracellulaire.

Kröning *et al* (2000) ont étudié l'effet des acides aminés contenant un atome de soufre sur l'entrée du CDDP dans des cellules épithéliales du tubule rénale et sur sa cytotoxicité. Les auteurs ont montré que seuls les acides aminés soufrés diminuent la cytotoxicité du CDDP avec dans l'ordre d'efficacité décroissante, la cystéine, la méthionine, l'homocystéine et la *N*-acetylcystéine. Ils ont

alors analysé l'effet de ces acides aminés sur l'entrée du CDDP dans des cellules rénales et ont montré que la présence de ces acides aminés inhibait la captation du CDDP par ces cellules avec un effet supérieur pour la cystéine. Ils ont alors préincubé du CDDP et de la cystéine pour former des adduits entre ces deux composés avant de traiter les cellules. Ils ont alors montré que le passage transmembranaire des adduits est supérieur à celui du CDDP seul. Malgré la présence de CDDP à l'intérieur de la cellule, l'effet cytotoxique n'est pas augmenté ce qui suggère que l'adduit Cys-CDDP est moins cytotoxique que le composé libre. Ainsi, la formation d'adduits peut expliquer la diminution de la cytotoxicité, mais pas la diminution de la captation. En fait, la présence de cystéine ou de méthionine dans le milieu extracellulaire inhibe la captation des adduits de façon compétitive et les auteurs apportent pour la première fois une preuve de l'existence d'un transporteur spécifique des adduits entre le CDDP et les acides aminés soufrés.

En conclusion, nous avons montré qu'une des premières réponses des cellules HeLa à un traitement par le carboplatine et le CDDP est une augmentation de l'activité GGT et du contenu intracellulaire en GSH. La surexpression de la GGT peut influencer ce contenu lorsque la cystéine est fournie aux cellules sous forme du tripeptide et dans ces conditions, les cellules HeLa-GGT résistent mieux aux deux composés testés. Cependant, les mécanismes de résistances mis en causes semblent être différents.

ARTICLE 2

« Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase. *Biochem Pharmacol.* (2002) 64, 207-16.

Daubeuf S, Leroy P, Paolicchi A, Pompella A, Wellman M, Galteau MM, Visvikis A.

Enhanced resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of γ -glutamyltransferase

Sandrine Daubeuf^a, Pierre Leroy^a, Aldo Paolicchi^b, Alfonso Pompella^b,
Maria Wellman^a, Marie Madeleine Galteau^a, Athanase Visvikis^{a,*}

^a*Thiols et Fonctions Cellulaires, Faculté de Pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy 1, 30 rue Lionnois, 54000 Nancy, France*

^b*Dipartimento di Patologia Sperimentale, Sezione di Patologia Generale, Scuola Medica, via Roma, I-56126 Pisa, Italy*

Received 7 November 2001; accepted 25 April 2002

Abstract

γ -Glutamyltransferase (GGT), which is a key enzyme for the cellular glutathione (GSH) homeostasis, was shown to be overexpressed in human tumor cells selected for resistance to cisplatin and to influence the resistance of experimental tumors *in vivo*. We first established that cisplatin treatment of HeLa cells was accompanied by an early 3-fold induction of GGT synthesis, enhancing the possibility that this enzyme plays an important role in the cell defenses against this anticancer drug. This role was then studied using a GGT-transfected HeLa cell line (HeLa-GGT) exhibiting 10 times the activity of the parental HeLa cells (120–150 and 10–14 mU/mg protein, respectively). Both cell lines showed comparable intracellular GSH levels and cisplatin resistance when cultured in high (250 μ M) or low (50 μ M) cysteine-containing medium. When 50 μ M of GSH were included in the low-cysteine culture medium only HeLa-GGT cells partially recovered their intracellular GSH and exhibited an increased resistance to cisplatin. Cisplatin treatment also inhibited GGT-dependent production of reactive oxygen species, a process depending on the availability of cysteinylglycine produced during GSH catabolism. Furthermore, we showed that cisplatin forms adducts with cysteinylglycine 10 times more rapidly than with GSH, and that these adducts were formed only in the extracellular medium of HeLa GGT cells. This extracellular mechanism could at least partially account for the increased resistance of GGT-rich cells to cisplatin. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Cisplatin resistance; γ -Glutamyltransferase; GSH catabolism

1. Introduction

The tripeptide γ -Glu-Cys-Gly (GSH) is the main non-protein intracellular thiol. It plays a crucial role in the maintenance of the intracellular redox state and thus protects the cell against oxidative injuries. GSH reacts also with many toxic agents to form conjugates which can be easily excreted by means of specific transporters [1]. The elevation of intracellular GSH has been widely demonstrated in cells resistant to platinum agents, especially cisplatin (CDDP) [2] and the depletion of GSH sensitizes

cells to these compounds [3]. However, it is not clear how GSH acts exactly, e.g. by complexing and exporting the drugs *via* the GSH-X pump [4], or by protecting cells against reactive oxygen species (ROS) [5], or also by increasing DNA repair [6]. The increase of intracellular GSH level in resistant cells could depend on induction of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), the rate-limiting enzyme in GSH synthesis, but several experimental evidences showed that under physiological conditions, cysteine availability, and not γ -GCS activity, is the key factor determining intracellular GSH synthesis [7]. In view of this, an important role could be played by γ -glutamyltransferase (GGT); in fact, GGT is a cell surface enzyme that initiates the cleavage of extracellular GSH, thereby providing GGT-positive cells with a secondary source of cysteine capable of enhancing the intracellular synthesis of GSH [8]. GGT activity was shown to be induced in cells selected for their resistance to CDDP [2,9] and in samples from a patient resistant to CDDP-based chemotherapy

* Corresponding author. Tel.: +33-3-83-68-21-54;
fax: +33-3-83-68-21-54.

E-mail address: visvikis@pharma.uhp-nancy.fr (A. Visvikis).

Abbreviations: GSH, glutathione; GGT, gamma-glutamyltransferase; cysgly, cysteinylglycine; γ -GCS, gamma-glutamylcysteine synthetase; CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum(II); LC-DMEM, low-cysteine DMEM; HC-DMEM, high-cysteine DMEM; ROS, reactive oxygen species; DHR-123, dihydrorhodamine-123; Rh-123, rhodamine-123.

[10]. CDDP is one of the most efficient anticancer agents against a number of solid tumors, but its use is limited by the frequent emergence of CDDP-resistant cell populations. Many studies showed a relationship between resistance and enzymes related to GSH metabolism in tumor samples or in established cell lines [11]. *In vitro* studies by the National Cancer Institute Drug Screening Program showed no relationship between GGT activity and resistance to alkylating agents [12], however these studies were performed in culture medium rich in cysteine, thus likely obscuring the role of GGT in providing an additional source for this amino acid.

The aim of this study was to investigate the role of GGT overexpression in cancer cell resistance to CDDP under physiological conditions. To do this, we compared under standard culture conditions (250 μ M of cysteine in the culture medium) and under culture conditions closer to the physiological concentrations of cysteine (50 μ M), the sensitivity to CDDP of an isogenic cell line overexpressing human GGT, HeLa-GGT, and the parental cell line, HeLa.

2. Material and methods

2.1. Cell lines, culture conditions and treatments

The HeLa-GGT cell line was established in our laboratory from HeLa-Tet-off (Clontech) cells, after stable transfection by the vector pTRE-GGT containing the full length cDNA of human GGT [13]. The full length sequences of the human GGT were cloned in the Hind III/XbaI sites of the pTRE2 vector and transfected along with the pTK-Hyg selection plasmid to HeLa cells using lipofectamine. Twenty-four hours after transfection, cells were seeded in 90 μ M Petri dishes at 4×10^5 cells/dish. The cells were allowed to attach, and hygromycin was added to the culture medium at 100 μ g/mL. Hygromycin-resistant colonies, which appeared after 3 weeks were individually picked up using cloning cylinders (Sigma), and expanded. When sufficient material was available, the GGT activity of each clone was measured. One clone named HeLa-GGT was found to express 125–150 mU of GGT/mg protein, and retained for this studies. The parental cell line expresses 10–15 times lower GGT activity (10–14 mU/mg protein).

Cells were grown in DMEM (Sigma, this medium contains 250 μ M cysteine and methionine, and will be referred as high-cysteine DMEM, HC-DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum (Boehringer), 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution (Sigma). The DMEM without cysteine and methionine (Sigma), was supplemented with 50 μ M cysteine and 50 μ M methionine (Gibco) (this medium will be referred as low-cysteine DMEM, LC-DMEM) and used for experiments in medium with low levels of sulfur-containing amino acids. Cultures were maintained at 37° in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂.

An amount of 5 mM *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) (Sigma) stock solution was prepared in 150 mM NaCl and stored at +4°. The stock was renewed every 4 weeks.

2.2. Analysis of GGT mRNAs expression

After 24 hr of CDDP treatment, total mRNA was extracted using the GenElute RNA extraction kit (Sigma). Total RNA of 4 μ g were used for reverse transcription with 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Promega) and 0.5 μ g oligo(dT)_{16–18} in 50 μ L containing 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT and 1 mM of each dNTP. GGT total mRNA was amplified using primers Amp1–Amp2 (sense primer: 5'-AATGGACGACTTCAGCTCTCC-3' and antisense primer 5'-AGCCGAACCAGAGGTTGTAGA-3'). β_2 -Microglobulin sequences were amplified with sense primer (5'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3') and antisense primer (5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'). Analysis of GGT subtype A, and C mRNAs expression was performed using subtype A primers (sense: 5'-CACAGGGGACATACAGTGAG-3', antisense: 5'-GAAATAGCTGAAGCACGCGC-3'), and subtype primers (sense: 5'-GCCAGAA-GTGAGAGCAGTT-3', antisense: 5'-TCCAGAAAGCAGCTAGAGGG-5') [14]. Results were normalized for the β_2 -microglobulin signal.

2.3. Measurement of GGT activity

GGT activity was determined using L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide and glycylglycine as donor and acceptor substrates as previously described [15], and was expressed as mU/mg protein (nmol of 5-nitrobenzoate/min/mg protein). Protein concentration was determined using BioRad reagent (Coomassie Blue) according to the manufacturer's recommendations and bovine serum albumin as standard.

2.4. Measurement of intracellular GSH and of extracellular GSH and cysteinylglycine (cysgly)

2.4.1. Sample preparation for intracellular GSH measurement

The cells were seeded in 6-well plates and cultured either in HC-DMEM or in LC-DMEM during 24 hr. Cells were then incubated for additional 24 hr in HC-DMEM or LC-DMEM in the presence or absence of 5 μ M CDDP. In addition the effect of 50 μ M GSH was tested in LC-DMEM in the presence or absence of 5 μ M CDDP. Cells were washed with cold PBS, scrapped in 500 μ L of 3.3% (w/v) perchloric acid, and centrifuged at 12,000 g for 5 min at +4°. The supernatant was used for thiol measurement and the pellet for protein determination. Both extracellular and intracellular samples were kept at –80° until HPLC analysis.

2.4.2. Sample preparation for extracellular thiol measurement

HeLa and HeLa–GGT cells seeded in 6-well plates 24 hr before experiment were incubated in DMEM containing 1 mM GSH at pH 7.4. Two hundred microliter aliquots of medium were sampled after selected culture periods and mixed with 200 μ L 3.3% (w/v) perchloric acid solution. Prior to HPLC analysis, samples were diluted 10-fold in a 0.9% (w/v) NaCl containing 4 mM EDTA.

2.4.3. HPLC analysis

The thiol measurements were performed using a reverse phase HPLC method including a reduction step of disulfide bonds with tri-*n*-butylphosphine (TBP) and precolumn derivatization with a thiol-selective fluorogenic reagent, 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide (ABD-F) as previously described [16]. Briefly, to 100 μ L of the above described samples, 50 μ L of the internal standard (thioglycolic acid, 0.3 M), 20 μ L 0.5 M NaOH (100 μ L in the case of intracellular medium), 250 μ L 0.2 M borate buffer pH 9.0, 50 μ L 5% (v/v) TBP, and 50 μ L 2.3 mM ABD-F were added. The resulting mixture was incubated at 50° for 20 min; then the derivatization reaction was stopped by adding 50 μ L 1 M HCl, and HPLC analysis was performed.

2.5. Survival assays

Cytotoxicity was assessed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. HeLa or HeLa–GGT cells were plated in 96-well plates and cultured for 24 hr in the appropriate medium. Then, cells were incubated in 200 μ L of medium containing the indicated concentrations of CDDP. After additional 24 hr of culture, 20 μ L MTT (5 mg/mL) were added to the cells, followed by incubation for 3 more hours. The resulting formazan product was solubilized in 200 μ L DMSO and spectrophotometrically measured at 595 nm.

2.6. Monitoring of reactive oxygen species production

Quantification of ROS was performed using the dihydrorhodamine-123 (DHR-123) probe which is oxidized by various ROS to the fluorescent rhodamine-123 (Rh-123) [17]. A stock solution of 10 mM DHR-123 was prepared in dimethylformamide. Cells were seeded in 6-well plates in HC-DMEM 24 hr before the experiment. Then, the cells were gently washed with 2 mL of PBS and incubated at 37° for 1 hr in PBS containing 1 mM GSH, 25 μ M DHR-123, 150 μ M Fe³⁺ and 165 μ M EDTA. Two hundred microliter aliquots of medium were withdrawn and fluorescence was measured using a microplate fluorimeter (Cytofluor 2350; Millipore; Bedford, MA, USA) at an excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. Acellular experiment containing 1 mM GSH, 25 μ M DHR-123 and 150 μ M Fe³⁺ and 165 μ M EDTA in PBS was used as control.

2.7. Analysis of GSH- and cystgly-CDDP adducts

The analysis of GSH–CDDP and cystgly–CDDP adducts was based on the protocols of Bernareggi *et al.* [18]. The HPLC system used to monitor the production of CDDP–thiol adducts included an isocratic pump, a valve-injector fitted with a 20 μ L loop (model Rheodyne 7125), a reverse-phase silica-based column (LiChrospher RP 18 end capped (5 μ m) 250 \times 4 mM; Merck Darmstadt) eluted with 0.35 mM triethylamine phosphate buffer pH 2.5 at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and a UV spectrophotometric detector operated at 230 nm. Data were recorded using an integrator. Retention times of CDDP, cystgly, GSH–CDDP, CDDP–cystgly, and GSH were ca. 2.7, 2.8, 3.0, 3.3 and 5.5 min, respectively. Stock solutions of CDDP and each thiol were prepared at a concentration of 3.3 mM in a 10 mM phosphate buffer pH 7.4 added with 150 mM NaCl. CDDP and thiol solutions were mixed in a 1:10 ratio (v/v), and the mixtures were incubated at 37°. At different time intervals ranging from 0 to 25 min, aliquots were withdrawn and immediately injected into the HPLC system. No significant difference between the molar absorbance of each thiol at 230 nm was observed and CDDP absorbance was at least 10-fold less than thiols at this wavelength. Thus, in order to calculate the formation rate of the adducts (expressed in mM/min), it was considered that the adduct absorbance was mainly due to the thiol contribution.

In order to study the formation of CDDP–cystgly adducts in the culture medium of the two cell lines, a new HPLC system was developed. It consists in a Aquasil C18 (3 μ m) 150 \times 3 mM i.d. column (thermo Hypersil) eluted with a 10 mM phosphate buffer pH 2.7 containing 5 mM pentanesulfonic acid, at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. UV detection was operated at 215 nm. The addition of the counter-ion (pentanesulfonic acid) allowed the efficient separation of CDDP–cystgly adducts from CDDP–GSH adducts, CDDP, GSH or cystgly. Retention times of CDDP, CDDP–GSH, GSH, cystgly and CDDP–cystgly and were ca. 2.0, 3.3, 5.8, 6.0 and 7.8 min, respectively.

2.8. Statistical analysis

All assays were set up in triplicate, and the results were expressed as the mean and standard deviation (mean \pm SD). Student's *t*-paired test was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Induction of GGT expression in HeLa cells after CDDP treatment

While cell lines made resistant to CDDP often show elevated intracellular GSH, γ -GCS and GGT activities [2], the effect of a single short-term CDDP treatment on GGT activity before the onset of resistance is not well

documented, especially in human cell lines. Thus, we first studied the modulation of GGT activity in HeLa cells after CDDP challenge. Sub-confluent HeLa cells were treated with various concentrations of CDDP (0–10 μM) for 24 and 48 hr, and GGT activity was measured in cell extracts.

As shown in Fig. 1A, GGT activity was rapidly induced in response to CDDP (1.4-fold after 24 hr treatment with 2.5 μM of CDDP). Maximum induction was observed after 48 hr for treatments with 2.5 and 5 μM of CDDP (2.8-fold). Treatment with higher CDDP concentrations (10 μM)

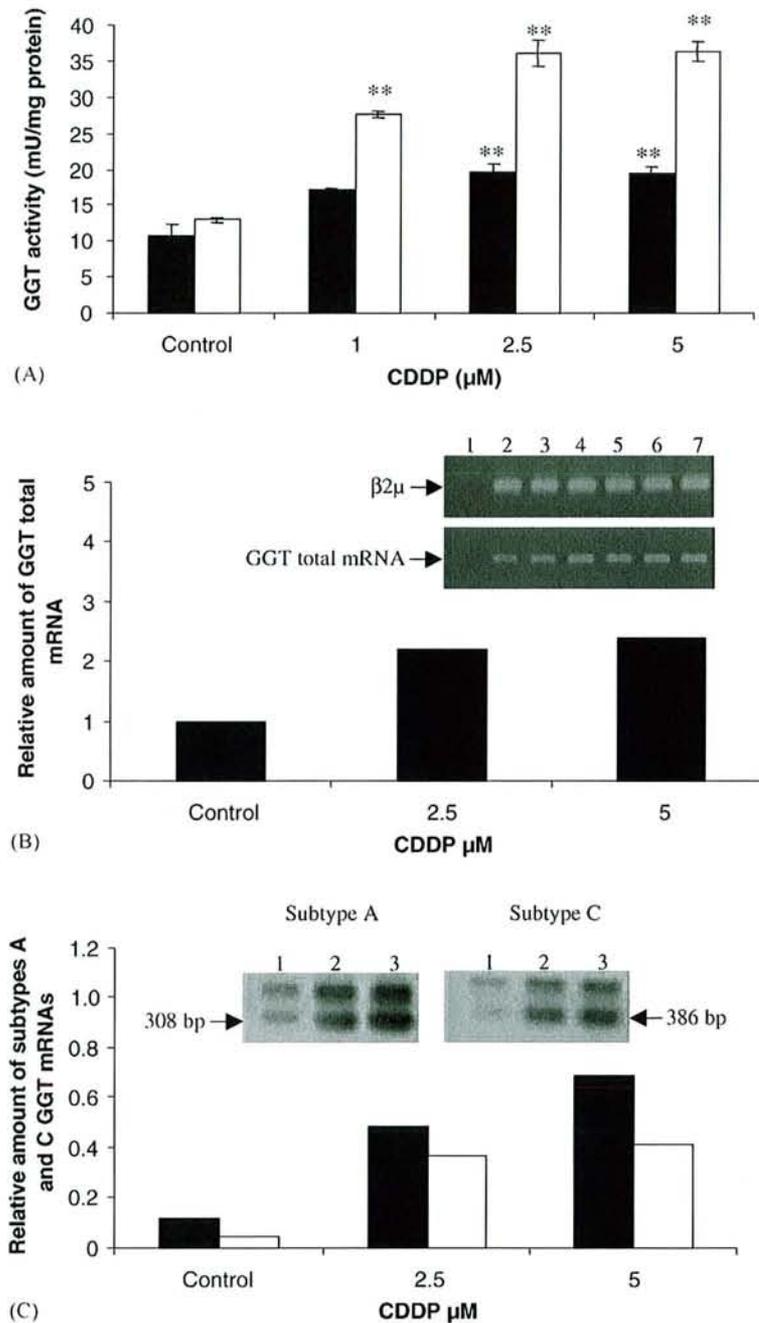


Fig. 1. CDDP treatment induces GGT synthesis in HeLa cells. (A) Induction of GGT activity: cells were treated with 0 (control), 1, 2.5, or 5 μM of CDDP for 24 hr (■) or 48 hr (□) and GGT activity was measured in whole cell extracts. Results shown are mean \pm SD of three experiments. $**P < 0.001$ vs. control cells. (B) Induction of GGT total mRNA level: cells were treated with 0 (control), 2.5 or 5 μM of CDDP 24 hr before total RNA extraction. RT-PCR was performed as described in Section 2. The relative amount of GGT total mRNA was obtained by the ratio GGT/ β_2 -microglobulin signals. Data are the mean of two independent experiments. Inserts: photographs of the corresponding agarose gels used for quantification of GGT and β_2 -microglobulin signals; lane 1: negative control; lanes 2 and 3: control cells; lanes 4 and 5: cells treated with 2.5 μM CDDP; lanes 6 and 7: cells treated with 5 μM CDDP. (C) Induction of GGT mRNA subtypes: RT-PCR was performed using either subtype A (■) or subtype C (□) specific primers, respectively, and followed by Southern blot. The relative amount of each GGT mRNA subtype was obtained by the ratio GGT subtype/ β_2 -microglobulin signals. Inserts: photographs of the corresponding Southern blot used for quantification of each GGT mRNA subtype level. The arrows indicate the expected bands, and the numbers the corresponding sizes. Lane 1: control cells; lane 2: cells treated with 2.5 μM CDDP; lane 3: cells treated with 5 μM CDDP.

resulted in a lower induction of GGT activity, likely due to an observed massive cell death (data not shown).

We then examined whether the induction of the GGT activity was due to an increase in the enzyme synthesis. Total RNA was extracted from control and CDDP-treated HeLa cells, and the GGT total mRNA level was evaluated by RT-PCR using Amp1–Amp2 primers; β_2 -microglobulin was used as an internal control. As shown in Fig. 1B, the GGT total mRNA level doubled after 24 hr treatment with 2.5 and 5 μ M of CDDP, thus showing that the increase in GGT activity after CDDP treatment, depended on the increase of the corresponding mRNA.

GGT type I mRNAs show a polymorphism in their 5' UTR due to alternative splicing events and probably to the use of different promoters [19]. We have previously shown that in HeLa cells, two subtypes (A and C) of GGT mRNA I were mainly expressed and that they were differently regulated after 12-*O*-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA), TNF α or butyrate treatment [14]. As shown in Fig. 1C, 24 hr CDDP treatment induced both subtypes. Subtype A was induced in a dose-dependent manner (by 5- and 7-fold after 2.5 and 5 μ M CDDP). Subtype C was induced by 4-fold by either treatments. Thus, the observed increase of GGT total mRNA I was due to the increase of at least these two particular subtypes.

Taken together, these results show that one of the early responses of HeLa cells to CDDP treatment is an increase in GGT synthesis and activity.

3.2. Establishment and characterization of HeLa–GGT cell line

We then asked whether the observed increase in GGT activity could provide an advantage to the cells exposed to CDDP. CDDP is mainly detoxified by conjugation with GSH and active transport outside the cell [4]. GGT can play a crucial role in CDDP detoxification by providing the precursors of GSH synthesis, especially when low concentrations of extracellular cysteine are present. In order to examine only the influence of an increased GGT activity, we transfected HeLa cells with the pTRE–GGT vector and we established a cell line expressing about 120–150 mU/mg of GGT. Both HeLa and HeLa–GGT cells had comparable γ -GCS activities (62 ± 2.5 and 58 ± 2 nmol γ -glucy formed/mg/min, respectively).

3.2.1. Intracellular GSH levels

We first studied the modifications in the intracellular GSH level of the parental HeLa and the transfected HeLa–GGT cell lines under different culture conditions, and in the presence or not of 5 μ M CDDP. Results are summarized in Table 1. Under standard culture conditions (HC–DMEM, 250 μ M cysteine), both cell lines presented comparable levels of intracellular GSH (39.5 ± 3.7 and 35.9 ± 3.5 nmol/mg for HeLa and HeLa–GGT cells, respectively). Decreasing the extracellular concentration of cysteine to 50 μ M (LC–DMEM), which is the concentration found in human serum, resulted in a dramatic decrease of the intracellular level of GSH (8-fold) in both cell lines, which still exhibited comparable levels of intracellular GSH (5.3 ± 2.5 and 3.7 ± 0.6 nmol/mg for HeLa and HeLa–GGT cells, respectively). Despite the low intracellular GSH level, the cell proliferation was not affected (not shown). When 50 μ M of GSH were added to the cells cultured in the LC–DMEM, we observed, only in HeLa–GGT cells, a 5-fold increase in the intracellular GSH level as compared either to the HeLa cells cultured in the same medium or to HeLa–GGT cells cultured in the LC–DMEM alone.

These results demonstrate that at physiologically low concentrations of cysteine, high GGT activity in the presence of extracellular GSH, can effectively enhance the intracellular GSH level.

Under every culture condition tested, in both HeLa–GGT and HeLa cell lines, treatment with 5 μ M CDDP for 24 hr increased the intracellular GSH level (Table 1), suggesting that the CDDP-dependent increase of intracellular GSH concentration was independent from the composition of the culture medium and from GGT activity.

3.2.2. Cytotoxicity of CDDP

We then studied, under the same culture conditions, the cytotoxicity of CDDP on the two cell lines and the cell viability was evaluated using the MTT assay.

As shown in Fig. 2A and B, the cytotoxicity of CDDP, was substantially the same in both HeLa and HeLa–GGT cell lines in the presence of low- or high-cysteine concentrations in the medium (IC_{50} 7.5 μ M in all conditions). These results indicate that, in these cellular models, variations of intracellular GSH, consequent to different cysteine availability, do not affect the CDDP toxicity. When 50 μ M

Table 1
Influence of extracellular cyst(e)ine concentration and CDDP treatment on intracellular GSH level

	GSH (nmol/mg protein)					
	250 μ M cys		50 μ M cys		50 μ M cys + 50 μ M GSH	
	–CDDP	+5 μ M CDDP	–CDDP	+5 μ M CDDP	–CDDP	+5 μ M CDDP
HeLa	39.5 ± 3.7	52.6 ± 6.4	5.3 ± 2.5	7.0 ± 0.8	4.0 ± 0.2	7.3 ± 2.8
HeLa–GGT	35.9 ± 3.5	43.6 ± 3.0	3.7 ± 0.6	9.3 ± 2.5	$19.3 \pm 4.7^{**}$	$27.0 \pm 2.6^{**}$

** $P < 0.001$ as compared HeLa cells cultured under the same conditions. Also significant to HeLa–GGT cells cultured in the presence of 50 μ M cys.

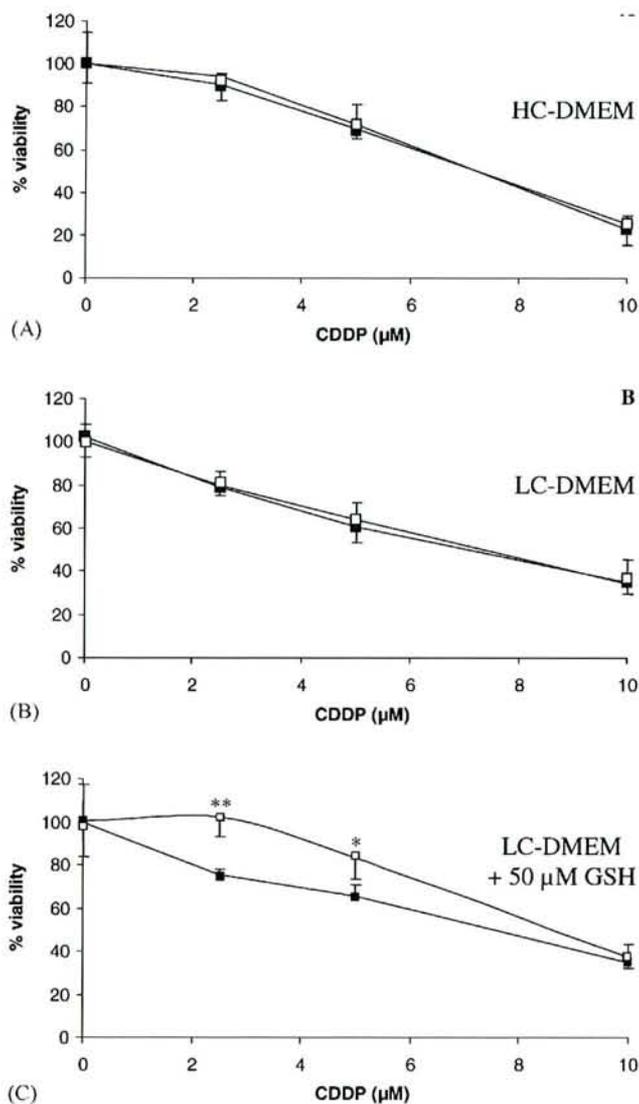


Fig. 2. CDDP cytotoxicity on HeLa and HeLa-GGT cells. HeLa (■) or HeLa-GGT (□) cells were seeded in 96-well plates and were incubated for 24 hr in the presence of indicated concentrations of CDDP. Viability was measured using MTT. (A) Cells were cultured in HC-DMEM (250 μ M cys); (B) cells were cultured in LC-DMEM (50 μ M cys); (C) cells were cultured in LC-DMEM supplemented with 50 μ M GSH. Results expressed as % of untreated control cells are the mean \pm SD of eight independent experiments. Statistical significance of differences in viability between HeLa and HeLa-GGT at the indicated CDDP concentrations: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

GSH was included in the LC-DMEM medium, HeLa-GGT cells showed a significantly higher viability and IC_{50} when challenged with 2.5 or 5 μ M of CDDP. In contrast there was no change of the observed toxicity of the drug on the HeLa cell line.

These results cannot be totally explained by the higher intracellular GSH content of HeLa-GGT cells (Table 1), because as we showed (Fig. 2A and B), the intracellular GSH concentration did not influence the CDDP toxicity. Therefore, we asked whether an extracellular event, depending on GGT and GSH, could be responsible for the observed higher resistance of HeLa-GGT cells.

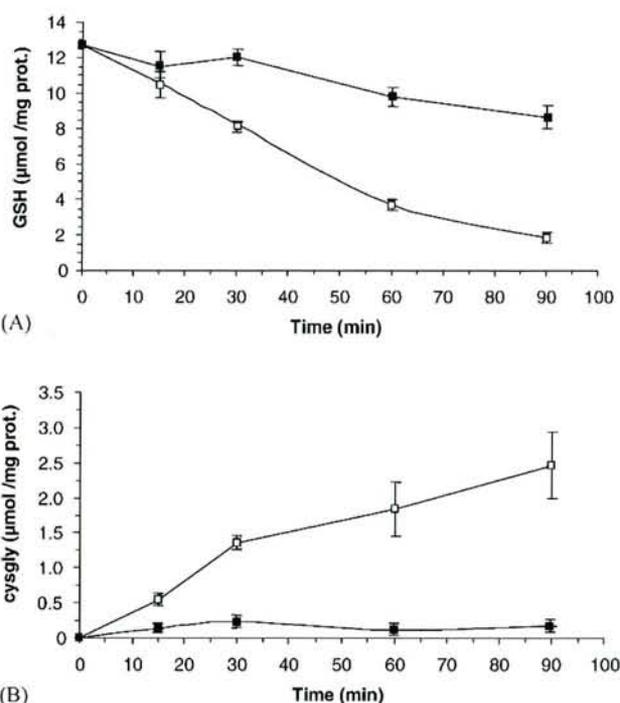


Fig. 3. Extracellular GSH catabolism and cystgly accumulation by HeLa and HeLa-GGT cells. HeLa (■) or HeLa-GGT (□) cells seeded in 6-well plates were incubated with 1 mM GSH in HC-DMEM. Samples of extracellular medium were withdrawn at various times, and GSH (A) and cystgly (B) concentrations were measured by HPLC. Values were adjusted for total cellular protein content. Results are mean \pm SD of three distinct experiments.

3.2.3. GSH metabolism

HeLa and HeLa-GGT cells were incubated in the presence of 1 mM GSH, and the degradation of the tripeptide and the appearance of cystgly were measured through a 90 min period. As shown in Fig. 3A, after 90 min HeLa cells consumed only 20% of the GSH present in the medium whereas during the same time period, HeLa-GGT cells consumed 90% of the extracellular tripeptide.

The GGT-dependent GSH catabolism was accompanied in HeLa-GGT cells by an accumulation of cystgly in the medium (Fig. 3B). As expected, in HeLa cells the cystgly accumulation was by far lower. These experiments confirmed that HeLa-GGT cells, due to their GGT activity, presented a higher rate of extracellular GSH degradation and cystgly accumulation.

3.2.4. ROS production

It is now well documented that in the presence of transition metals, GSH catabolism leads to the production of ROS [20]. HeLa and HeLa-GGT cells were incubated in the presence of GSH and an iron source, and the ROS production was evaluated by the oxidation rate of DHR-123 to Rh-123. As shown in Fig. 4, both cell lines produced a significant amount of ROS. As expected, HeLa-GGT cells, due to their higher GGT activity produced 2.3 times more ROS than HeLa cells. When CDDP was included to the incubation medium, ROS production

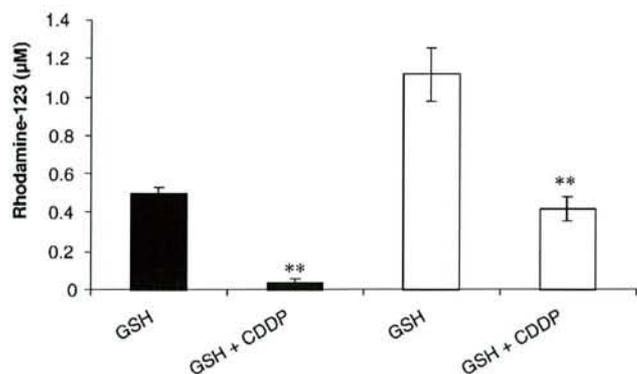


Fig. 4. Extracellular ROS production by HeLa and HeLa-GGT cells. HeLa (■) or HeLa-GGT (□) cells seeded in 6-well plates were incubated for 60 min with 0.5 mM GSH, 160 µM Fe³⁺-EDTA and 25 µM DHR-123 in the absence or in the presence of 50 µM CDDP. ROS production was measured as DHR-123 oxidation. Results shown are mean ± SD of three distinct experiments. ***P* < 0.001 vs. cells incubated in the absence of CDDP.

was inhibited by 92% for HeLa cells and by 62% for HeLa-GGT cells.

Production of ROS by the GGT-dependent catabolism is due to the high reactivity of the thiol group of cystyly. It is also well documented that CDDP can react with the thiol group of GSH to form different types of adducts [4,18]. An explanation for the inhibition of GGT-dependent ROS production by CDDP could be its reaction either with GSH or with cystyly thus blocking the reactive thiol group.

Consequently, we verified this hypothesis by measuring the rate of *in vitro* formation of adducts between GSH or cystyly and CDDP.

3.3. Formation of GSH- and cystyly-CDDP complexes

The production of each corresponding adduct with a 1:1 stoichiometric ratio (CDDP-GSH and CDDP-cystyly) was measured using HPLC after a short incubation period

(within 15 min), and its production rate was considered in the present work to reflect the reactivity of each thiol with CDDP.

As shown in Fig. 5, cystyly-CDDP adduct formation reached very rapidly (within 5 min) a plateau while the production of GSH-CDDP adducts remained linear for up to 15 min. The rate of formation of cystyly-CDDP adducts (0.1126 mM/min), calculated on the linear part of the curve, was 10 times higher than the rate of formation of GSH-CDDP adducts (0.0102 mM/min).

The previous HPLC system, used to point out the difference between the reactivity of GSH and cystyly, was unable to fully separate GSH-CDDP adducts from cystyly-CDDP adducts. In order to characterize the presence of cystyly-CDDP adducts in the culture medium of the two tested cell lines, a new HPLC system using a counter ion in the mobile phase was developed. With this system cystyly-CDDP adduct is well separated from GSH and CDDP, while cystyly alone coelutes with GSH and GSH-CDDP adduct coelute with glygly (glycylglycine, an acceptor of γ-glutamyl group). HeLa and HeLa-GGT cells were incubated in PBS containing 1 mM GSH, 5 mM glygly and 100 µM CDDP. Samples were withdrawn at various time intervals and analyzed. As shown in Fig. 6, a peak corresponding to the cystyly-CDDP adduct was observed only for HeLa-GGT cells (compare Fig. 6B and C, incubation time 100 min), indicating that this mechanism is dependent on GGT catalytic activity.

Taken together, these results can explain why the HeLa-GGT cells show an increased resistance to CDDP only when GSH is present in the extracellular medium. GGT-dependent catabolism of GSH results in the production of highly reactive cystyly which in its turn forms extracellular adducts with CDDP, thus either lowering the availability or inactivate the drug. However, at higher concentrations of CDDP (10 µM), this mechanism seems to be unable to protect the cells.

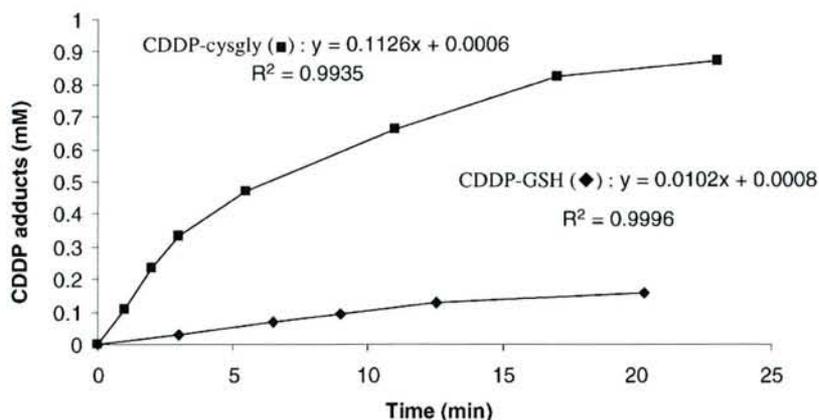


Fig. 5. Formation of CDDP-GSH and CDDP-cystyly adducts *in vitro*; 1 mM of CDDP was incubated either with 10 mM GSH (◆) or with 10 mM cystyly (■) in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 at 37°. Samples were withdrawn at various times and the CDDP adducts were measured by HPLC. Values are from one out of three experiments which gave the same pattern. The equations were derived from the linear part of the graph (0–3 min for CDDP-cystyly adducts and 0–15 min for CDDP-GSH adducts, respectively).

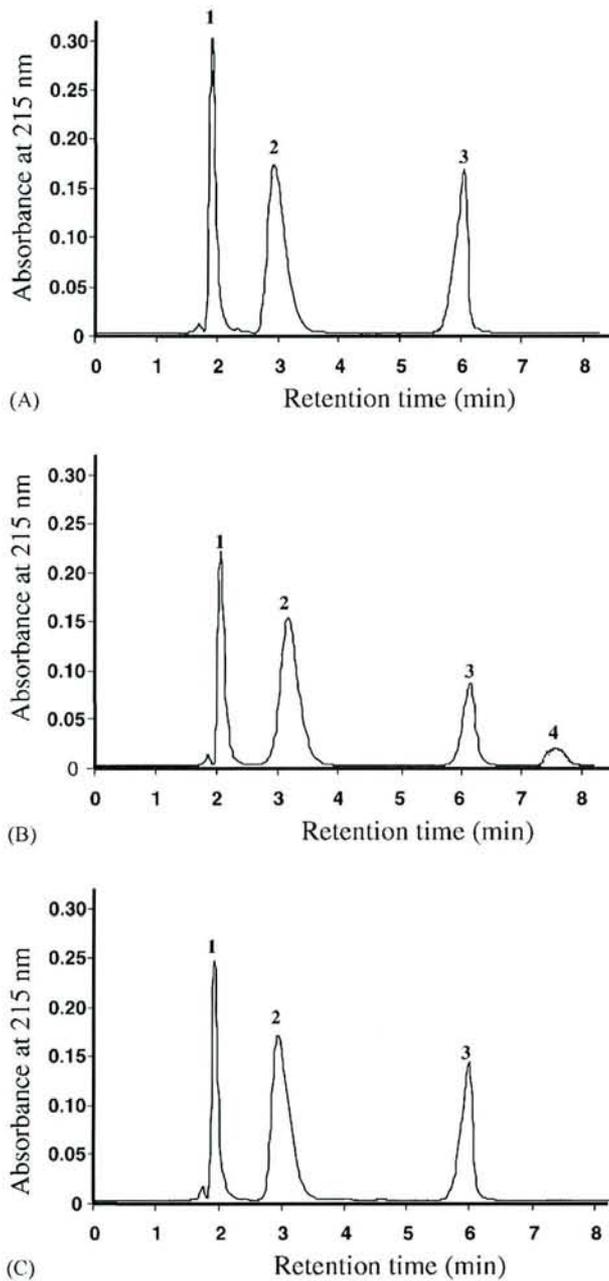


Fig. 6. Formation cygly-CDDP adducts in extracellular medium. Cells were incubated with 1 mM GSH, 5 mM glygly and 100 μ M CDDP in PBS at 37°. Extracellular medium was used for HPLC analysis at time = 0 (A) and 100 min for HeLa-GGT cells (B) or HeLa cells (C). Retention times are: 2, 3, 3.3, 5.8, 6 and 7.8 for, respectively, CDDP (1), glygly and GSH-CDDP adduct (2), GSH and cygly (3) and CDDP-cygly adduct (4).

4. Discussion

CDDP-resistant cell lines, isolated after prolonged exposure to low doses of this drug, have been valuable tools for the elucidation of the factors leading to CDDP resistance, which is often multifactorial. Resistance to alkylating agents and platinum derived drugs can involve a modification of the uptake of the drug [21], or an increased inactivation of the drug by sulfhydryl group containing molecules such as GSH [4] or an increased export [22]. It

has been shown that in human leukemia cells, γ -GCS is increased after CDDP treatment coordinately with the MRP/GSH pump [22]. Such a response could allow the cells to increase their GSH synthesis and therefore to have a higher scavenging rate of the drug and to export more efficiently the GSH-CDDP complexes.

The resistance can also be the consequence of an enhanced DNA repair mechanism. CDDP challenge of human ovarian cancer cells resulted in the induction of ERCC-1 which is a critical factor in the nucleotide excision-repair pathway that performs CDDP-DNA adducts repair [23]. Furthermore, alterations in the expression of oncogenes (such as *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* or *c-abl*) or tumor suppressor genes (such as *p53*) (for review see [24]) have also been implicated in the cellular resistance to CDDP.

GGT which is a key enzyme for the cellular GSH homeostasis has been shown to be overexpressed in different types of cancer such as ovarian [25], prostate [26] or lung [27]. Induction of GGT has been observed in human tumor cells selected for resistance to chemotherapeutic drugs [10]. We first showed that an early response of HeLa cells to a short exposure to CDDP is an increase in GGT expression. The enzyme activity was induced 3-fold after 48 hr with 2.5 μ M CDDP treatment and the inductions were correlated with an earlier accumulation of the GGT mRNA. Godwin *et al.* [2] have also shown a correlation between the degree of resistance of human ovarian cancer cell lines and the level of GGT mRNA. However, these cells were obtained after a long-term exposure to the drug. They also found that the GGT mRNA was induced earlier in the acquisition of the CDDP resistance than the γ -GCS mRNA. The mechanisms responsible for the increase of GGT synthesis cannot be well explained. CDDP treatment can increase *c-fos* and *c-jun* [24], and one possible mechanism could be through activation of AP-1. This could be true for the γ -GCS induction as the gene promoter sequences contain two AP-1 responsive elements [28]. For the human GGT gene only the promoter controlling the transcription of type B GGT mRNA I has been described and it contains AP-1-like responsive elements [19]. Although inducible by TPA [14], this type of mRNA is barely expressed in HeLa cells. In addition, type A and C GGT mRNA I are the major GGT mRNA forms and they are both induced by CDDP. Thus, the increase in the total GGT mRNA level can be attributed to the increase of these two subtypes. However, no information exists for the promoters controlling the expression of these two GGT mRNAs.

We then focused on the role of GGT in the response of HeLa cells to CDDP using two models: the HeLa-Tet-off cells expressing 10–14 mU/mg of GGT, and the same cell line stably transfected with the human GGT sequences and expressing a higher level of the enzyme (10–15-fold as compared to the parental cell line). This approach was chosen in order to avoid any interference from other pathways contributing to CDDP resistance. Indeed, to evaluate each parameter individually, studies with well-defined systems, such as the use of isogenic cell lines are needed.

Despite the difference in GGT activity, the two cell lines exhibited comparable γ -GCS activities and intracellular GSH concentrations either in low- or high-cysteine containing culture medium. Although culture in the low-cysteine medium resulted to a dramatic decrease (-80%) of the intracellular GSH, no differences in the cellular viability were observed. HeLa-GGT cells could recover about 50% of their intracellular GSH pool when GSH was added extracellularly. Thus, cells with high GGT activity can have the advantage for recovering intracellular GSH only when extracellular GSH is present and used as cysteine source. These data are in accordance with previous works on cellular and animal models which showed that a main function of GGT is to provide the cell with cysteine [29,30] and with the study of Saint Vincent *et al.* [7], who demonstrated that the limiting step in biosynthesis of GSH is not the step catalyzed by γ -GCS, but the availability of cysteine.

The CDDP cytotoxicity under both (low- and high-cysteine) culture conditions on the two cell lines remained comparable. These results suggest that, under these conditions, in HeLa cells, overexpression of GGT and intracellular GSH levels are not influencing the resistance to CDDP. In contrast to our observations, previous studies have shown that GSH depletion increased CDDP cytotoxicity [31,32]. In these studies the GSH depletion was achieved by pre-treatment of the cells with BSO, which is a potent inhibitor of γ -GCS, the key enzyme in GSH biosynthesis. This discrepancy can then be explained by the fact that BSO-treated cells have not only a low GSH content but that they are also unable to replenish their low GSH pool after CDDP treatment. Under our conditions, γ -GCS remains fully active and thus it can restore any GSH consumed by CDDP. In addition CDDP treatment of HeLa and HeLa-GGT cells led to an increase of the intracellular GSH under all conditions tested.

HeLa-GGT cells were found more resistant to CDDP treatment when a low (50 μ M) amount of GSH were added to the culture medium. An hypothesis to explain this phenomenon can be that the HeLa-GGT cells can more efficiently catabolize the extracellular GSH, thus providing the cell with precursors for a higher turnover rate of the intracellular GSH. In this case cells could detoxify CDDP more efficiently. Earlier studies by Hanigan [33] also led to the same conclusion. By establishing experimental GGT-poor and GGT-rich tumors in animal models, these authors have shown that GGT-rich tumors grew twice faster than the GGT-poor counterparts. GGT-rich tumors were also more resistant to CDDP treatment, but they exhibited the same intracellular GSH content than the GGT-poor tumors. They concluded that the resistance of GGT-rich tumors may result from the ability of these cells to replenish intracellular GSH levels more rapidly when low amounts of cysteine (such as in blood) are available.

However, this explanation may not be satisfactory for our model. In fact, when HeLa and HeLa-GGT cells were

cultured in a high- or low-cysteine containing medium, the IC_{50} for CDDP was the same. We can expect that in the high-cysteine medium the turnover of intracellular GSH is faster than in the low-cysteine medium and thus cells should exhibit an increased resistance, which is not the case in our model. We therefore looked for another GGT- and GSH-dependent mechanism to explain the increased resistance of HeLa-GGT cells when GSH was added extracellularly.

The extracellular degradation of GSH by GGT is accompanied by the appearance of extracellular cystgyl, a strongly reactive thiol, which in the presence of transition metals can lead to the production of ROS [20]. We showed that HeLa and HeLa-GGT cells can produce ROS extracellularly, with the HeLa-GGT cells producing twice the amount of ROS as compared to their untransfected counterparts. This difference can be explained by the higher rate of GSH consumption by HeLa-GGT cells. Interestingly, when CDDP was included in the incubation medium, ROS production was partially inhibited. CDDP can react with the SH group of GSH or other SH containing molecules to form different types of adducts [18]. It is then logical to assume that CDDP can react with cystgyl and even faster than with GSH as the SH group of cystgyl is by far more reactive. Accordingly to this and using an *in vitro* system, we showed that the rate of formation of cystgyl-CDDP adducts is at least 10 times higher than the rate of formation of GSH-CDDP adducts. We also showed that significant amounts of cystgyl-CDDP adducts accumulate only in the extracellular medium of HeLa-GGT cells demonstrating that extracellular production of cystgyl by increased GGT activity allows the formation of these adducts.

It is also important to note that the CDDP concentrations used in this study were very close to the blood concentrations of the drug during cancer treatment. Indeed, Riva *et al.* [34] reported that the maximum concentration of CDDP in blood of patients during phase II trials reached 4 μ M. Thus, in our experimental models the induction of GGT and the modulation of the resistance of the HeLa cells to CDDP toxicity due to an increased GGT activity are physiologically relevant.

In conclusion, we showed in this study that an early response of HeLa cells to CDDP treatment is an increase of GGT synthesis. Increased GGT activity can influence the intracellular GSH levels only under low-cysteine culture conditions and when GSH is present in the culture medium. Also, only under these particular conditions the cells exhibited an increased resistance to CDDP toxicity independently to the intracellular GSH content. We propose that the resistance to CDDP is due to a mechanism which in the first step occurs at the extracellular level. GGT cleavage of GSH results in the production of cystgyl which in turn can rapidly form adducts with CDDP, thus detoxifying the drug. Further studies are in progress to ascertain whether this detoxification mechanism leads to a lower intracellular accumulation of the drug, or to a decreased formation of DNA-CDDP adducts.

Acknowledgments

The authors would like to thank, the “Ligue Nationale contre le Cancer de Meurthe et Moselle,” for the funding of this work. S. Daubeuf was supported by a grant from “Ligue Nationale contre le Cancer.” Thanks to Maxime Lenoir for technical help. Additional funds were provided by the Associazione Italiana Ricerca sul Concro (A.I.R.C., Italy).

References

- [1] Ishikawa T, Ali-Osma F. The ATP-dependent glutathione *S*-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 1992;17:463–8.
- [2] Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang S, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3070–4.
- [3] Hromas RA, Andrews PA, Murphy MP, Burns CP. Glutathione depletion reverses cisplatin resistance in murine L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 1987;34:9–13.
- [4] Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated *cis*-diamminedichloroplatinum(II) metabolism. *J Biol Chem* 1993;268:20116–25.
- [5] Masuda H, Tanaka T, Takahama U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1175–80.
- [6] Lai GM, Ozols RF, Young RC, Hamilton TC. Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:535–9.
- [7] Saint Vincent BR, Mousset S, Jacquemin-Sablon A. Cysteine control over glutathione homeostasis in chinese hamster fibroblasts over-expressing a γ -glutamylcysteine synthetase activity. *Eur J Biochem* 1999;262:873–8.
- [8] Hanigan MH, Ricketts WA. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 1993;32:6302–6.
- [9] El-akawi Z, Zdanowicz J, Creaven PJ, Abu HM, Perez R, Pendyala L. Induction of γ -glutamyl transpeptidase mRNA by platinum complexes in a human ovarian carcinoma cell line. *Oncol Res* 1996;8:415–23.
- [10] Lewis AL, Hayes JD, Wolf CR. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 1988;9:1283–7.
- [11] Nishimura T, Newkirk K, Sessions RB, Andrew PA, Trock BJ, Russmussen AA, Montgomery EA, Bischoff EK, Hanigan MH, Cullen KJ. Association between expression of glutathione-associated enzymes and response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. *Chem Biol Interact* 1998;111:333–42.
- [12] Tew KD, Monks A, Barone L, Rosser G, Akerman G, Montali JA, Wheatley JB, Schmidt DE. Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol Pharmacol* 1991;51:5181–7.
- [13] Courtay C, Oster T, Michelet F, Visvikis A, Diederich M, Wellman M, Siest G. GGT: nucleotide sequence of the human pancreatic cDNA. *Biochem Pharmacol* 1992;43:2527–33.
- [14] Daubeuf S, Accaoui MJ, Pettersen I, Huseby NE, Visvikis A, Galteau MM. Differential regulation of γ -glutamyltransferase mRNAs in four human tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1568:67–73.
- [15] Schiele F, Artur Y, Bagrel D, Petitclerc C, Siest G. Measurement of plasma gamma-glutamyltransferase in clinical chemistry: kinetic basis and standardisation propositions. *Clin Chim Acta* 1981;112:187–95.
- [16] Salazar JF, Schorr H, Herrmann W, Herbeth B, Siest G, Leroy P. Measurement of thiols in human plasma using liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr Sci* 1999;37:469–76.
- [17] Royall J, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrohodamine-123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Chem Biophys* 1993;302:348–55.
- [18] Bernareggi A, Torti L, Maffei Facino R, Carini M, Depta G, Casetta B, Farrell N, Spadacini S, Ceserani R, Tognella S. Characterization of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry. Evidence for their formation *in vitro* but not *in vivo* after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients. *J Chromatogr B* 1995;669:247–63.
- [19] Visvikis A, Pawlak A, Accaoui MJ, Ichino K, Leh H, Guellaen G, Wellman M. Structure of the 5' sequences of the human γ -glutamyltransferase gene. *Eur J Biochem* 2001;268:317–25.
- [20] Drozd R, Parmentier C, Hachad H, Leroy P, Siest G, Wellman M. γ -Glutamyltransferase-dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Rad Biol Med* 1998;25:786–92.
- [21] Hromas RA, North JA, Burns CP. Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 1987;36:197–201.
- [22] Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Tien KM. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J Biol Chem* 1996;271:14981–8.
- [23] Li Q, Gardner K, Zhang L, Tsang B, Bostick-Bruton F, Reed E. Cisplatin induction of *ERRC-1* mRNA in A2780/CP70 human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 1998;36:23419–25.
- [24] Kartalou M, Essigman JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001;478:23–43.
- [25] Hanigan MH, Frierson Jr HF, Brown JE, Lovel MA, Taylor PT. Human ovarian tumors express γ -glutamyl transpeptidase. *Cancer Res* 1994;54:286–90.
- [26] Frierson Jr HF, Theodorescu D, Mills SE, Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase in normal and neoplastic prostate glands. *Mod Pathol* 1997;10:1–6.
- [27] DeYoung BR, Frierson Jr HF, Swanson PE, Hanigan MH. γ -Glutamyl transpeptidase immunoreactivity in human neoplasia. *Mod Pathol* 1996;9:144A.
- [28] Rahman I, Smith CA, Antonicelli F, MacNee W. Characterization of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit promoter: a critical role for AP-1. *FEBS Lett* 1998;427(1):129–33.
- [29] Hanigan MH, Ricketts WA. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 1993;32:6302–6.
- [30] Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, Carter BZ, Barrios R, Ou CN, Chévez-Barrios P, Wang Y, Habib GM, Goodman JC, Huang SL, Lebovitz RM, Matzuk MM. Growth retardation and cysteine deficiency in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7923–6.
- [31] Pendyala L, Perez R, Weinstein A, Zdanowicz J, Creaven PJ. Effect of glutathione depletion on the cytotoxicity of cisplatin and iproplatin in a human melanoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;40:38–44.
- [32] Andrews PA, Murphy MP, Howell SB. Differential potentiation of alkylating and platinating agent cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells by glutathione depletion. *Cancer Res* 1985;45:6250–3.
- [33] Hanigan MR. Expression of gamma-glutamyl transpeptidase provides tumor cells with a selective growth advantage at physiologic concentrations of cyst(e)ine. *Carcinogenesis* 1995;16:181–5.
- [34] Riva C, Lavieille JP, Schmerber S, Cuisini O, Reyt E. 5-Fluorouracil and folinic acid using a weekly 24 hr infusion schedule for locally advanced head and neck cancer: a pharmacokinetic and clinical survey. *Int J Oncol* 2000;3:543–9.

**CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES**

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude de la régulation de l'expression de la GGT humaine.

- ✓ Nous avons constaté que les modulations de l'activité GGT sont toujours corrélées avec les modulations du taux d'ARNm I_T ce qui suggère que l'expression de la GGT humaine est régulée au niveau de son ARNm, soit par des modifications de sa $\frac{1}{2}$ vie, soit par une régulation au niveau transcriptionnel.
- ✓ Nous avons montré que les modulations de chacun des 3 sous types participent à la modulation de l'ARNm I_T et donc, aux variations de l'activité GGT.
- ✓ Enfin, les variations indépendantes de chaque sous type, ainsi que leur régulation spécifique du type cellulaire, suggèrent fortement l'existence de promoteurs indépendants pour chacun de ces messagers (comme c'est le cas pour le rat et la souris).

Afin d'expliquer les différents mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation différentielle des 3 messagers de la GGT, il nous a paru important d'approfondir cette étude, d'une part en localisant et en caractérisant de nouveaux promoteurs sur le gène I de la GGT humaine et d'autre part en recherchant les éléments de réponse à différents stimuli.

A partir d'ARN extrait de placenta et par des expériences de 5' RACE, nous sommes parvenus à localiser sur le gène le début de l'ARNm I_C , et nous avons cloné cette région en amont d'un gène rapporteur. Nous avons alors étudié l'activité promotrice de cette séquence par des transfections transitoires dans deux lignées cellulaires (HeLa et HepG2).

- ✓ Nous avons montré que dans ces deux lignées, la région en position - 489 à + 70 possède une forte activité promotrice (comparable à celle du promoteur SV40 dans les cellules HeLa), et que la région - 856 à + 70 possède une activité promotrice encore plus importante.
- ✓ Nous avons également montré que ce promoteur est régulé en réponse à des stimuli comme un traitement au TPA ou au NaBu de manière spécifique du type cellulaire. De plus, les modulations de l'activité promotrice des deux fragments sont toujours corrélées aux modulations de l'ARNm I_C en réponse aux mêmes stimuli.

Nous avons donc mis en évidence un nouveau promoteur sur le gène I de la GGT humaine responsable du contrôle de l'expression de l'ARNm I_C. Chez l'homme, comme chez le rat ou la souris, l'expression du gène de la GGT est contrôlée par plusieurs promoteurs et la spécificité cellulaire de l'expression et de la régulation de l'enzyme est au moins en partie, liée à la régulation spécifique des différents promoteurs.

Nous nous sommes aussi intéressés à la régulation du promoteur B par le TPA dans deux lignées cellulaires (HeLa et HepG2). En nous basant sur la structure du promoteur, nous avons décidé de cibler notre étude sur le rôle potentiel des 3 sites de fixation AP1 proximaux. Pour cela, des fragments du promoteur différant par leur taille ont été clonés en amont du gène de la luciférase et les activités promotrices ont été mesurées dans les deux lignées cellulaires.

- ✓ Nous avons montré que dans la lignée HepG2, l'activité promotrice est comparable pour les 3 fragments testés (indépendante de la longueur des séquences). Au contraire, dans la lignée cellulaire HeLa, l'activité promotrice basale augmente proportionnellement à la longueur du fragment cloné en amont de la luciférase.
- ✓ La modulation de l'activité promotrice par le TPA se fait également de façon spécifique du type cellulaire : pour la lignée HeLa, l'inductibilité diminue avec la longueur de la séquence et dans les cellules HepG2, l'ajout des séquences comprises entre - 348 et - 560 potentialise l'induction par le TPA, alors que les séquences situées en amont (fragment pGGT B₋₇₄₈) inhibent l'induction de l'activité promotrice par le TPA.

Le promoteur B, tout comme le promoteur C, est régulé différemment en fonction de la lignée cellulaire considérée.

Dans les deux lignées cellulaires étudiées, le fragment pGGT B₋₃₄₈ porte une activité promotrice qui est induite en réponse au TPA. Ce fragment contient 2 sites potentiels pour la fixation du facteur de transcription AP1 et un site ARE dont nous avons testé la fonctionnalité par des expériences de retardement sur gel.

- ✓ Nous avons montré que le traitement au TPA induit le facteur AP1 dans les cellules HeLa et HepG2.

- ✓ Le facteur AP1 induit par le TPA se fixe sur le site AP1-II du promoteur B dans les deux lignées et contient au moins de la sous unité cJun.

Ces résultats permettent pour la première fois de proposer un mécanisme de régulation de l'expression de la GGT qui est résumé dans la figure 51:

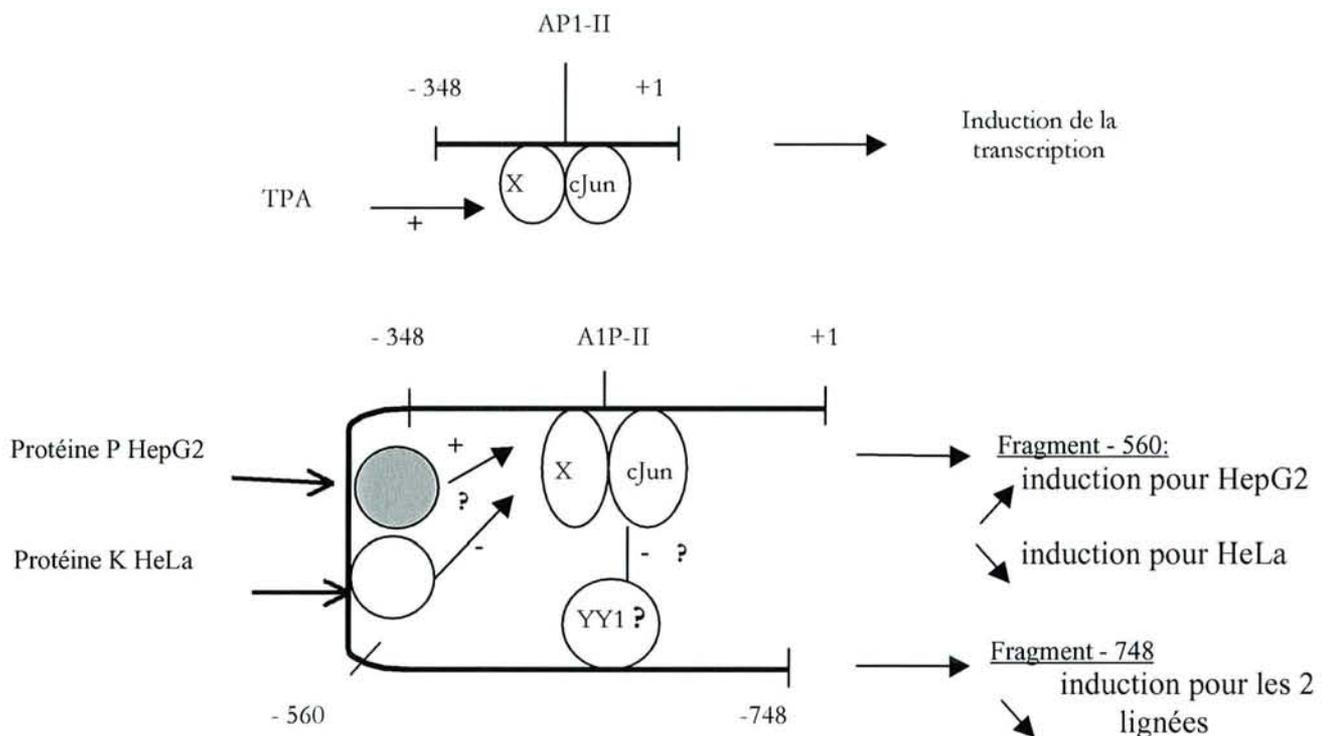


Figure 51 : Mécanisme proposé pour la régulation du promoteur B par le TPA dans les deux lignées cellulaires HeLa et HepG2.

Lors de l'induction par le TPA, le facteur AP1 composé d'une sous unité cJun et d'une sous unité X non définie vient se fixer au site AP1-II, ce qui entraîne une induction de la transcription. Les séquences comprises entre les positions - 348 et - 560 régulent cette induction. Ainsi, dans la lignée HepG2, la fixation d'une protéine spécifique (protéine P) va potentialiser cette augmentation alors que dans la lignée cellulaire HeLa, la fixation d'une protéine différente (protéine K) va entraîner une diminution de la transactivation du gène rapporteur.

Dans les deux lignées cellulaires la présence des séquences de - 560 à - 748 entraîne une diminution de l'induction par le TPA qui peut s'expliquer par la présence de site de

reconnaissance pour des protéines inhibant l'action de AP1, comme par exemple la protéine YY1.

Nous avons montré pour la première fois que la facteur AP1 est responsable de la régulation du promoteur B et éventuellement du promoteur C. Ce travail devra être complété par la caractérisation des autres sites de fixation de ce facteur sur les deux promoteurs ainsi que par la caractérisation des complexes protéiques qui s'y fixent. Cette étude peut ensuite être élargie à l'étude d'autres stimuli induisant les facteurs AP1 ou «AP1-like» en regardant de quelle manière ils influencent l'activité des promoteurs du gène de la GGT.

Il est évident que la caractérisation du promoteur C débutée dans ce travail, devra être approfondie en déterminant avec plus de précision le site + 1 d'initiation de la transcription.

La suite logique serait de déterminer s'il existe un autre promoteur indépendant pour la transcription des ARNm I_A .

Dans la deuxième partie de notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la GGT dans la réponse cellulaire au CDDP et au carboplatine. En effet, cette enzyme est parfois induite dans les cellules résistantes à ces anticancéreux et elle joue un rôle majeur dans la synthèse du GSH intracellulaire souvent incriminé dans la résistance à de nombreux traitements thérapeutiques.

Le développement de chimiorésistances s'accompagne le plus souvent de la modification de nombreux paramètres cellulaires, et il est impossible d'évaluer la contribution de chacun d'entre eux dans la résistance observée.

Afin d'étudier spécifiquement le rôle de la GGT dans les résistances aux dérivés du platine, nous avons choisi d'utiliser une approche utilisant un couple de lignées cellulaires modèles, HeLa et HeLa-GGT, la première lignée présentant une activité GGT faible (10 à 15 mU/mg de protéines) et la seconde étant transfectée par l'ADNc de la GGT humaine exprime l'enzyme à un niveau 10 fois supérieur (150 mU/mg de protéines). Ainsi, nous pouvons comparer les réponses cellulaires aux différents traitements dans ces lignées modèles que seule l'activité GGT différencie.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence du CDDP et du carboplatine sur l'expression de la GGT et sur le taux de GSH intracellulaire dans la lignée parentale HeLa, et nous avons montré que les deux agents ont pour conséquence **une induction rapide et importante de l'expression de la GGT ainsi que du taux de GSH intracellulaire. Ces résultats suggèrent que la GGT peut avoir une implication dans la réponse cellulaire au CDDP et à ses dérivés.**

En utilisant différentes conditions de culture, nous avons montré que les cellules HeLa-GGT possèdent un avantage pour la synthèse de leur GSH intracellulaire lorsque la cystéine est fournie aux cellules sous forme de GSH. Dans ces conditions, les cellules qui expriment fortement la GGT dégradent plus rapidement le GSH extracellulaire et peuvent utiliser les acides aminés produits pour la synthèse *de novo* du tripeptide. Les conditions de culture utilisant un milieu appauvri en cystéine et une source de GSH extracellulaire sont celles qui se rapprochent le plus des conditions physiologiques où la cystéine (acide aminé limitant dans la synthèse du GSH intracellulaire) est présente à de faibles concentrations (environ 50 μ M dans le plasma humain) et où du GSH circulant est présent. Dans ces conditions de culture, **la surexpression de la GGT entraîne une résistance accrue aux deux agents.**

Afin d'expliquer les mécanismes dépendant de la GGT responsables de cette résistance accrue, nous avons étudié le rôle de la GGT dans la synthèse du GSH intracellulaire et le rôle du GSH intracellulaire dans la résistance aux agents.

- ✓ **Nous avons alors montré une corrélation directe entre la résistance au carboplatine et la concentration en GSH intracellulaire. Pour cet agent, la GGT intervient dans la résistance en permettant aux cellules de renouveler plus rapidement leur GSH intracellulaire à partir du GSH extracellulaire.**
- ✓ **Au contraire, dans notre modèle cellulaire, la concentration intracellulaire en GSH n'influence pas la cytotoxicité du CDDP.**

Ainsi, la surexpression de la GGT est impliquée dans la résistance cellulaire au carboplatine et au CDDP, mais les mécanismes mis en jeu semblent différents.

Pour expliquer la plus grande résistance des cellules HeLa-GGT au CDDP en présence de GSH, nous nous sommes intéressés aux mécanismes extracellulaires.

- ✓ Nous avons montré que la CysGly produite au niveau extracellulaire par le catabolisme du GSH par la GGT peut réagir avec le CDDP pour former des adduits.
- ✓ Nous avons montré que les adduits CysGly-CDDP se forment plus rapidement que les adduits GSH-CDDP.
- ✓ En utilisant une source de GGT purifiée, nous avons également démontré que la GGT est responsable de la formation des adduits CysGly-CDDP en présence de GSH et de CDDP.
- ✓ Enfin, nous avons mis en évidence la formation de ces adduits dans le milieu de culture des cellules surexprimant la GGT, alors qu'ils sont indétectables dans le milieu de culture des cellules HeLa.

Sur la base des résultats obtenus, nous proposons un nouveau mécanisme de résistance impliquant la formation d'adduits entre le CDDP et la CysGly. La formation de ces adduits au niveau extracellulaire des cellules exprimant fortement la GGT diminuerait la cytotoxicité et/ou la disponibilité de la molécule active.

La figure 52 présente le modèle hypothétique que nous proposons permettant d'expliquer le rôle de la GGT dans la résistance au CDDP et au carboplatine.

La différence entre les deux agents provient de la différence de réactivité et de stabilité. Le carboplatine est beaucoup plus stable et ne forme pas d'adduits avec le GSH ou la CysGly dans les temps courts. Son action est plus lente et le contenu intracellulaire en GSH semble être un facteur déterminant dans la réponse cellulaire à cet agent. *In vivo*, la surexpression de la GGT peut apporter aux cellules un avantage pour la synthèse de leur GSH intracellulaire et des tumeurs riches en GGT seront probablement réfractaires à une chimiothérapie au carboplatine ou à d'autres dérivés du platine connus pour être activés à l'intérieur de la cellule.

Au contraire, le CDDP étant beaucoup plus réactif, il peut spontanément former des adduits avec le GSH et la CysGly et ce mécanisme semble participer à la résistance des cellules HeLa-GGT au CDDP lorsqu'elles sont en présence de GSH extracellulaire.

Les perspectives ouvertes par cette étude sont nombreuses car les mécanismes que nous suggérons sont totalement nouveaux et à ce jour encore inexplorés.

Il faudrait déterminer la (les) structure(s) des adduits entre le CDDP et la CysGly ainsi que leur existence et leur significativité *in vivo* pourrait être évaluée sur des modèles animaux puis dans une étude clinique.

Les lignées cellulaires HeLa et HeLa-GGT nous semblent un modèle de choix pour approfondir *in vitro* les différents mécanismes de résistance au CDDP. La caractérisation de ces deux lignées devra être complétée en identifiant et en quantifiant les autres enzymes impliquées dans la synthèse, le métabolisme et l'export du GSH (participant directement ou indirectement aux défenses contre le CDDP). De cette manière, nous pourrions mieux évaluer l'implication de la GGT dans la résistance au CDDP.

Nos résultats n'évaluent pas non plus le devenir de l'adduit CysGly-CDDP et il faudrait étudier l'entrée de ces adduits dans la cellule ainsi que leur capacité à former des adduits avec l'ADN. La réponse à ces questions permettra de mieux expliquer la réponse des cellules HeLa-GGT au CDDP.

En conclusion, nous avons identifié et partiellement caractérisé certains des mécanismes responsables de la régulation de l'expression de la GGT humaine. Nous avons aussi démontré pour la première fois le rôle précis que cette enzyme peut jouer dans les défenses cellulaires au CDDP et à ses dérivés.

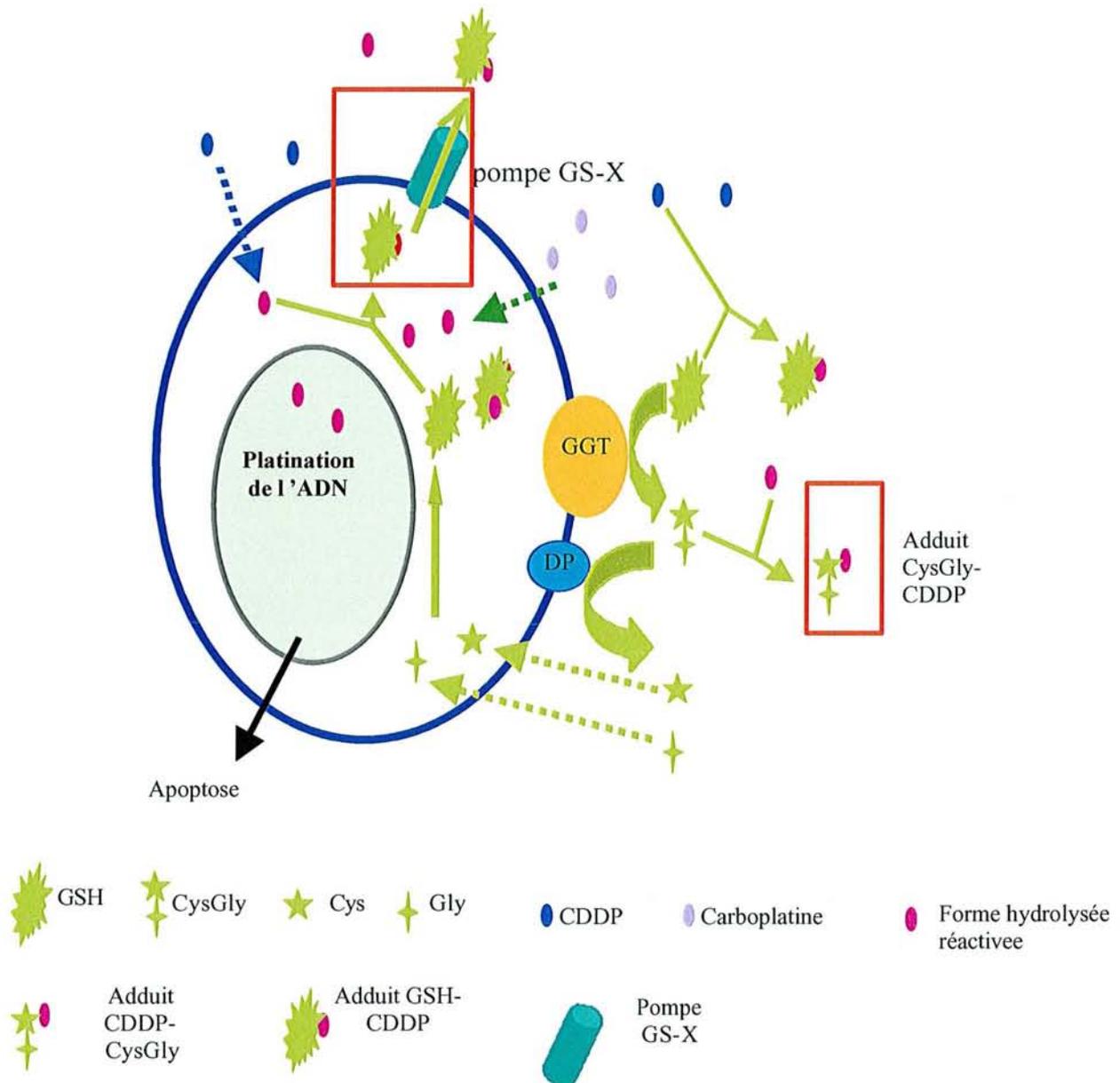


Figure 52: Mécanisme hypothétique illustrant le rôle de la GGT dans la résistance au CDDP et au Carboplatine le CDDP s'hydrolyse rapidement pour former la molécule active qui peut réagir immédiatement avec la CysGly produite lors du catabolisme du GSH par la GGT. La formation de ces adduits limite alors la disponibilité du platine et /ou sa cytotoxicité. Les cellules HeLa-GGT deviennent donc plus résistantes.

Le carboplatine, qui s'hydrolyse plus lentement ne réagit pas au niveau extracellulaire, mais il rentre dans la cellule où il est detoxifié par le GSH. Pour ce composé, la concentration intracellulaire en GSH est un facteur primordial et la GGT intervient en favorisant l'apport des acides aminés nécessaires à sa synthèse.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Accaoui MJ, Enoiu M, Mergny M, Masson C, Dominici S, Wellman M, Visvikis A (2000). Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF-kB. *Biochem. Biophys Res Commun*, **276**, 1062-1067.

Ainbinder E, Bergelson S, Pinkus R, and Daniel V (1997). Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1 (AP-1)-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents. *Eur J Biochem*, **243**, 49-57.

Anderson ME, Meister A (1983). Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 707-11.

Andrews PA, Murphy MP, Howell SB (1985). Differential potentiation of alkylating and platinating agent cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells by glutathione depletion. *Cancer Res*, **45**, 6250-3.

Andrews PA, Murphy MP, Howell SB (1987). Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, **19**, 149-54.

Arner ES, Nakamura H, Sasada T, Yodoi J, Holmgren A, Spyrou G (2001). Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radic Biol Med*, **31**, 1170-8.

Baik JH, Chikhi N, Bulle F, Giuili G, Guellaen G, Siegrist S (1992). Repetitive 5-azacytidine treatments of Fao cells induce a stable and strong expression of gamma-glutamyl transpeptidase. *Cell Physiol*, **153**, 408-16.

Baik JH, Siegrist S, Giuili G, Lahuna O, Bulle F, Guellaen G (1992). Tissue- and developmental-stage-specific methylation in the two kidney promoters of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene. *Biochem J*, **287**, 691-4.

Barouki R, Finidori J, Chobert MN, Aggerbeck M, Laperche Y, Hanoune J (1984). Biosynthesis and processing of gamma-glutamyl transpeptidase in hepatoma tissue culture cells. *J Biol Chem*, **259**, 7970-4.

Beck DJ, Popoff S, Sancar A, Rupp WD (1985). Reactions of the UVRABC excision nuclease with DNA damaged by diamminedichloroplatinum(II). *Nucleic Acids Res*, **13**, 7395-412.

Bernareggi A, Torti L, Maffei Facino R, Carini M, Depta G, Casetta B, Farrell N, Spadacini S, Ceserani R, Tognella S (1995). Characterisation of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry. Evidence for their formation in vitro but not in vivo after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients, *J Chrom B*, **669**, 247-263.

Bianchi L, Tacchini L, Matteucci E, Desiderio MA (2002). A cluster region of AP-1 responsive elements is required for transcriptional activity of mouse ODC gene by hepatocyte growth factor. *Arch Biochem Biophys*, **401**, 115-23.

Blommaert FA, van Dijk-Knijnenburg HC, Dijt FJ, den Engelse L, Baan RA, Berends F, Fichtinger-Schepman AM (1995). Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry*, **34**, 8474-80.

Brouillet A, Darbouy M, Okamoto T, Chobert MN, Lahuna O, Garlatti M, Goodspeed D, Laperche Y (1994). Functional characterization of the rat gamma-glutamyl transpeptidase promoter that is expressed and regulated in the liver and hepatoma cells. *J Biol Chem*. **269**, 14878-84.

Brown R, Hirst GL, Gallagher WM, McIlwrath AJ, Margison GP, van der Zee AG, Anthony DA (1997). hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene*, **15**, 45-52.

Bulle F, Mattei MG, Siegrist S, Pawlak A, Passage E, Chobert MN, Laperche Y, Guellaen G (1987). Assignment of the human gamma-glutamyl transferase gene to the long arm of chromosome 22 *Hum Genet*, **76**, 283-6.

Carriere V, Dussaulx E, Rousset M, Zweibaum A, Cambier D (1998). Decreased expression of gamma-glutamyltranspeptidase in the intestinal cell line Caco-2 by inducers of cytochrome P450 1A1. *Biochem Pharmacol*, **56**, 817-23.

Carter BZ, Wiseman AL, Orkiszewski R, Ballard KD, Ou CN, Lieberman MW (1997). Metabolism of leukotriene C4 in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *J Biol Chem*, **272**, 12305-10.

Chikhi N, Holic N, Guellaen G, Laperche Y (1999). Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **122**, 367-80.

Collins JE, Mungall AJ, Badcock KL, Fay JM, Dunham I (1997). The organization of the gamma-glutamyl transferase genes and other low copy repeats in human chromosome 22q11. *Genome Res*, **7**, 522-31

Comess KM, Burstyn JN, Essigmann JM, Lippard SJ (1992). Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts. *Biochemistry*, **31**, 3975-90.

Cornwell PD, Watkins JB 3rd (2001). Changes in the kinetic parameters of hepatic gamma-glutamyltransferase from streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim Biophys Acta*, **1545**, 184-91.

Courtay C, Heisterkamp N, Siest G, Groffen J (1994). Expression of multiple gamma-glutamyltransferase genes in man. *Biochem J*, **297**, 503-8

Courtay C, Oster T, Michelet F, Visvikis A, Diederich M, Wellman M, Siest G (1992). Gamma-glutamyltransferase: nucleotide sequence of the human pancreatic cDNA. Evidence for a ubiquitous gamma-glutamyltransferase polypeptide in human tissues. *Biochem Pharmacol*, **43**, 2527-33.

Cowan DB, Weisel RD, Williams WG, Mickle DA (1993). Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J Biol Chem*, **268**, 26904-10.

Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest*, **94**, 703-8.

Del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E (1999). Hydrogen peroxide produced during γ -glutamyltranspeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J*, **13**, 69-79.

Diederich M, Wellman M, Visvikis A, Puga A, Siest G (1993). The 5' untranslated region of the human gamma-glutamyl transferase mRNA contains a tissue-specific active translational enhancer. *FEBS Lett*, **332**, 88-92.

Djavaheri-Mergny M, Accaoui MJ, Rouillard D, Wietzerbin J (2002). γ -glutamyl transpeptidase activity mediates NF-kappaB activation through lipid peroxidation in human leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem*, **232**, 103-11.

Dominici S, Valentini M, Maellaro E, Del Bello B, Paolicchi A, Lorenzini E, Tongiani R, Comporti M, Pompella A (1999). Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: The role of γ -glutamyl transpeptidase-dependent H₂O₂ production and S-thiolation. *Free Radic Biol Med*, **27**, 623-635.

Drozd R, Parmentier C, Hachad H, Leroy P, Siest G, Wellman M (1998). Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radic. Biol. Med*, **7**, 786-92.

Drummond JT, Anthony A, Brown R, Modrich P (1996). Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutLalpha and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J Biol Chem*, **271**, 19645-8.

Dvorakova L, Krusek J, Stastny F, Lisy V (1996). Relationship between kinetic properties of gamma-glutamyl transpeptidase and the structure of its saccharide moiety. *Biochim Biophys Acta*, **1292**, 163-7.

El-akawi Z, Zdanowicz J, Creaven PJ, Abu-hadid M, Perez R, Pendyala L (1996). Induction of gamma-glutamyl transpeptidase mRNA by platinum complexes in a human ovarian carcinoma cell line. *Oncol Res.*; **8**, 415-23.

El Yaagoubi M, Hachad H, Leh H, Siest G, Wellman M (1995). gamma-Glutamyltransferase expression during all-trans retinoic acid-induced differentiation of hematopoietic cell lines. *FEBS Lett*, **369**, 183-6.

El Yaagoubi M, Visvikis A, Khalid A, Siest G, Wellman M (1998). 5-Azacytidine modulates gamma-glutamyltransferase and glutathione levels in two human prostatic adenocarcinoma cell lines. *Biochem Mol Biol Int*, **46**, 321-31.

Emdin M, Passino C, Michelassi C, Titta F, L'abbate A, Donato L, Pompella A, Paolicchi A (2001). Prognostic value of serum gamma-glutamyl transferase activity after myocardial infarction. *Eur Heart J*, **22**, 1802-7.

Fabbro C, Braghetta P, Girotto D, Piccolo S, Volpin D, Bressan GM (1999). Cell type-specific transcription of the alpha1(VI) collagen gene. Role of the AP1 binding site and of the core promoter. *J Biol Chem*, **274**, 1759-66.

Fan S, el-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, Fornace AJ Jr, Magrath I, Kohn KW, O'Connor PM (1994). p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res*, **54**, 5824-30

Figlewicz DA, Delattre O, Guellaen G, Krizus A, Thomas G, Zucman J, Rouleau GA (1993). Mapping of human gamma-glutamyl transpeptidase genes on chromosome 22 and other human autosomes. *Genomics*, **17**, 299-305.

Fujiwara K, Katyal SL, Lombardi B (1982). Influence of age, sex and cancer on the activities of gamma-glutamyl transpeptidase and of dipeptidyl aminopeptidase IV in rat tissues. *Enzyme*, **27**, 114-8.

Funato T, Ishii T, Kanbe M, Scanlon KJ, Sasaki T (1997). Reversal of cisplatin resistance in vivo by an anti-fos ribozyme. *In Vivo*, **11**, 217-20.

Gately DP, Howell SB (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer*, **67**, 1171-6.

Gebauer G, Mirakhur B, Nguyen Q, Shore SK, Simpkins H, Dhanasekaran N (2000). Cisplatin-resistance involves the defective processing of MEKK1 in human ovarian adenocarcinoma 2008/C13 cells. *Int J Oncol*, **16**, 321-5.

Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME (1992). High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3070-4.

Goodspeed DC, Dunn TJ, Miller CD, Pitot HC (1989). Human gamma-glutamyl transpeptidase DNA: comparison of hepatoma and kidney mRNA in the human and rat. *Gene*, **76**, 1-9.

Goto S, Yoshida K, Morikawa T, Urata Y, Suzuki K, Kondo T (1995). Augmentation of transport for cisplatin-glutathione adduct in cisplatin-resistant cancer cells. *Cancer Res*, **55**, 4297-301.

Greengard O, Head JF, Goldberg SL, Kirschner PA (1986). Pulmonary carcinoid tumors: enzymic discriminants, growth rate, and early age of inception. *Cancer Res*, **46**, 2600-5.

Griffiths SA, Good VM, Gordon LA, Hudson EA, Barrett MC, Munks RJ, Manson MM (1995). Characterization of a promoter for gamma-glutamyl transpeptidase activated in rat liver in response to aflatoxin B1 and ethoxyquin. *Mol Carcinog*, **14**, 251-62.

- Hall AG (1999). The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest*, **29**, 238-45.
- Hanigan MH, Frierson HF Jr, Brown JE, Lovell MA, Taylor PT (1994). Human ovarian tumors express gamma-glutamyl transpeptidase. *Cancer Res*, **54**, 286-90.
- Hanigan MH, Frierson HF Jr (1996). Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem*, **44**, 1101-8.
- Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V (1999). Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis*, **20**, 553-9.
- Hanigan MH, Ricketts WA (1993). Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry*, **32**, 6302-6.
- Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA (1996). Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, **56**, 892-8.
- Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Ikegami H, Kimura A, Matsuoka T, Jikihara H, Mercola D, Murata Y (1999). Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *J Biol Chem*, **274**, 31648-54.
- Hendrich S, Campbell HA, Pitot HC (1987). Quantitative stereological evaluation of four histochemical markers of altered foci in multistage hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*, **8**, 1245-50.
- Heisterkamp N, Groffen J (1988). Duplication of the bcr and gamma-glutamyl transpeptidase genes. *Nucleic Acids Res*, **16**, 8045-56.
- Heudi O, Brisset H, Cailleux A, Allain P (2001). Chemical instability and methods for measurement of cisplatin adducts formed by interactions with cysteine and glutathione. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **39**, 344-9.
- Holic N, Suzuki T, Corlu A, Couchie D, Chobert MN, Guguen-Guillouzo C, Laperche Y (2000). Differential expression of the rat gamma-glutamyl transpeptidase gene promoters along with differentiation of hepatoblasts into biliary or hepatocytic lineage. *Am J Pathol*, **157**, 537-48.
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem*, **268**, 19675-80.
- Huang ZA, Yang H, Chen C, Zeng Z, Lu SC (2000). Inducers of gamma-glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression. *Biochim Biophys Acta*, **1493**, 48-55.
- Hudson EA, Munks RJ, Manson MM (1997). Characterization of transcriptional regulation of gamma-glutamyl transpeptidase in rat liver involving both positive and negative regulatory elements. *Mol Carcinog*, **20**, 376-88.

Iida T, Mori E, Mori K, Goto S, Urata Y, Oka M, Kohno S, Kondo T (1999). Co-expression of gamma-glutamylcysteine synthetase subunits in response to cisplatin and doxorubicin in human cancer cells. *Int J Cancer*, **82**, 405-11.

Ikeda Y, Fujii J, Taniguchi N, Meister A (1995). Expression of an active glycosylated human gamma-glutamyl transpeptidase mutant that lacks a membrane anchor domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 126-30.

Ishikawa T, Ali-Osman F (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem*, **268**, 20116-25.

Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Kuo MT (1996). Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J Biol Chem*, **271**, 14981-8.

Izawa S, Maeda K, Sugiyama K, Mano J, Inoue Y, Kimura A (1999). Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **274**, 28459-65.

Jang SI, Steinert PM, Markova NG (1996) Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem*, **271**, 24105-14.

Jeyapaul J, Jaiswal AK (2000). Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem Pharmacol*, **59**, 1433-9.

Johnson SW, Laub PB, Beesley JS, Ozols RF, Hamilton TC (1997). Increased platinum-DNA damage tolerance is associated with cisplatin resistance and cross-resistance to various chemotherapeutic agents in unrelated human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, **57**, 850-6.

Jornot L, Junod AF (1997). Hyperoxia, unlike phorbol ester, induces glutathione peroxidase through a protein kinase C-independent mechanism. *Biochem J*, **326**, 117-23.

Kalyanaraman B, Karoui H, Singh RJ, Felix CC (1996). Detection of thiyl radical adducts formed during hydroxyl radical- and peroxynitrite-mediated oxidation of thiols, a high resolution ESR spin-trapping study at Q-band (35 GHz). *Anal Biochem*, **241**, 75-81.

Kang YJ, Emery D, Enger MD (1991). Buthionine sulfoximine induced growth inhibition in human lung carcinoma cell do not correlate with glutathione depletion. *Cell Biol Toxicol*, **7**, 249-61.

Karp DR, Shimooku K, Lipsky PE (2001). Expression of gamma-glutamyl transpeptidase protects Ramos B cells from oxidation-induced cell death. *J Biol Chem*, **276**, 3798-804.

Kartalou M, Essigmann JM (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*, **478**, 23-43.

- Kawai K, Kamatani N, Georges E, Ling V (1990). Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *J Biol Chem*, **265**, 13137-42.
- Kern W, Braess J, Friedrichsen S, Kaufmann CC, Schleyer E, Hiddemann W (2001). Carboplatin pharmacokinetics in patients receiving carboplatin and paclitaxel/docetaxel for advanced lung cancers impact of age and renal function on area under the curve. *J Cancer Res Clin Onco*, **127**, 64-8.
- Khan KN, Tsutsumi T, Nakata K, Kato Y. (1999) Sodium butyrate induces alkaline phosphatase gene expression in human hepatoma cells. *J Gastroenterol Hepatol*, **14**, 156-62.
- Klatt P, Molina EP, De Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galesteo E, Barcena JA, Lamas S (1999). Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J*, **13**, 1481-90.
- Kugelman A, Choy HA, Liu R, Shi MM, Gozal E, Forman HJ (1994). gamma-Glutamyl transpeptidase is increased by oxidative stress in rat alveolar L2 epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **11**, 586-92.
- Lan ZJ, Palladino MA, Rudolph DB, Labus JC, Hinton BT (1997). Identification, expression, and regulation of the transcriptional factor polyomavirus enhancer activator 3, and its putative role in regulating the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNA-IV in the rat epididymis. *Biol Reprod*, **57**, 186-93.
- Lee KB, Parker RJ, Bohr V, Cornelison T, Reed E (1993). Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. *Carcinogenesis*, **14**, 2177-80.
- Lee S, Greenspan DS (1995). Transcriptional promoter of the human alpha 1(V) collagen gene (COL5A1). *Biochem J*, **310**, 15-22.
- Leh H, Courtaut C, Gerardin P, Wellman M, Siest G, Visvikis A (1996). Cloning and expression of a novel type (III) of human gamma-glutamyltransferase truncated mRNA. *FEBS Lett*, **394**, 258-62.
- Leh H, Chikhi N, Ichino K, Guellaen G, Wellman M, Siest G, Visvikis A (1998). An intronic promoter controls the expression of truncated human gamma-glutamyltransferase mRNAs. *FEBS Lett*, **434**, 51-6.
- Leroy P, Nicolas A, Wellman M, Michelet F, Oster T, Siest G (1993) Evaluation of o-phthalaldehyde as ifunctional fluorogenic post-column reagent for glutathione in LC. *Chromatographia* **36**, 130-134
- Li Q, Tsang B, Bostick-Bruton F, Reed E (1999). Modulation of excision repair cross complementation group 1 (ERCC-1) mRNA expression by pharmacological agents in human ovarian carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, **57**, 347-53.

Li YC, Seyama T, Godwin AK, Winokur TS, Lebovitz RM, Lieberman MW (1988). MTrasT24, a metallothionein-ras fusion gene, modulates expression in cultured rat liver cells of two genes associated with in vivo liver cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 344-8.

Lieberman MW, Barrios R, Carter BZ, Habib GM, Lebovitz RM, Rajagopalan S, Sepulveda AR, Shi ZZ, Wan DF (1995). gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions?, *Am J Pathol*, **147**, 1175-85.

Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, Carter BZ, Barrios R, Ou CN, Chevez-Barrios P, Wang Y, Habib GM, Goodman JC, Huang SL, Lebovitz RM, Matzuk MM (1996). Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7923-6.

Maellaro E, Dominici S, Del Bello B, Valentini MA, Pieri L, Perego P, Supino R, Zunino F, Lorenzini E, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A (2000). Membrane gamma-glutamyltranspeptidase activity of melanoma cells: effects on cellular H₂O₂ production, cell surface protein thiol oxidation and NF-kappa B activation status. *J Cell Sci*, **113**, 2671-2678.

Markey CM, Rudolph DB, Labus JC, Hinton BT (1998). Oxidative stress differentially regulates the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs in the initial segment of the rat epididymis. *J Androl*, **19**, 92-9.

Masuda H, Tanaka T, Takahama U (1994). Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun*, **203**, 1175-80

Matsuda Y, Tsuji A, Katunuma N (1983b). Membrane bound gamma-glutamyltranspeptidase: its structure, biosynthesis and degradation. *Adv Enzyme Regul*, **21**, 103-19.

Matsuda Y, Tsuji A, Katunuma N (1983a). Studies on the structure of gamma-glutamyltranspeptidase. III. Evidence that the amino terminus of the heavy subunit is the membrane binding segment. *J Biochem (Tokyo)*, **93**, 1427-33.

Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res*, **52**, 6885-91.

Meister A, Anderson ME, Hwang O (1986). Intracellular cysteine and glutathione delivery systems. *J Am Coll Nutr*, **5**, 137-51.

Meister A, Tate SS, Griffith OW (1981). Gamma-glutamyl transpeptidase. *Methods Enzymol*, **77**, 237-53.

Meister A and Anderson ME (1983). Gutathione. *Ann Rev Biochem*, **52**, 711-760.

Mihm S, Galter D, Droge W (1995). Modulation of transcription factor NF kappa B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *FASEB J*, **9**, 246-52.

Meroni SB, Suburo AM, Cigorraga SB (2000). Interleukin-1beta regulates nitric oxide production and gamma-glutamyl transpeptidase activity in sertoli cells. *J Androl*, **21**, 855-61.

Miller AM, Sandler E, Kobb SM, Eastgate J, Zucali J (1993). Hematopoietic growth factor induction of gamma-glutamyl transferase in the KG-1 myeloid cell line. *Exp Hematol*, **1**, 9-15.

Mistry P, Kelland LR, Abel G, Sidhar S, Harrap KR (1991). The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *Br J Cancer*, **64**, 215-20.

Moellering D, Mc Andrew J, Patel RP, Forman HJ, Mulcahy RT, Jo H, Darley-Usmar VM (1999). The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcystein synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase. *FEBS Lett*, **448**, 292-6

Moggs JG, Szymkowski DE, Yamada M, Karran P, Wood RD (1997). Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*, **25**, 480-91

Moorehead RA, Singh G (2000). Influence of the proto-oncogene c-fos on cisplatin sensitivity. *Biochem Pharmacol*, **59**, 337-45.

Morales A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Mari M, Colell A, Ardite E, Fernandez-Checa JC (1997). Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem*, **272**, 30371-9.

Morrow CS, Cowan KH, Goldsmith ME (1989). Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene. *Gene*, **75**, 3-11.

Munday R, Winterbourn CC (1989). Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. *Biochem Pharmacol*, **38**, 4349-52.

Murphy D, McGown AT, Crowther D, Mander A, Fox BW (1991). Metallothionein levels in ovarian tumours before and after chemotherapy. *Br J Cancer*, **63**, 711-4.

Nagata J, Kijima H, Hatanaka H, Asai S, Miyachi H, Takagi A, Miwa T, Mine T, Yamazaki H, Nakamura M, Kondo T, Scanlon KJ, Ueyama Y (2001). Reversal of cisplatin and multidrug resistance by ribozyme-mediated glutathione suppression. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 406-13

Nakamura H, Bai J, Nishinaka Y, Ueda S, Sasada T, Ohshio G, Imamura M, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J (2000). Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox-regulating proteins, in pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev*, **24**, 53-60.

Nash B, Tate SS (1984). In vitro translation and processing of rat kidney gamma-glutamyl transpeptidase. *J Biol Chem*, **259**, 678-85.

Newkirk K, Heffern J, Sloman-Moll E, Sessions RB, Rasmussen AA, Andrews PA, Cullen KJ (1997). Glutathione content but not gamma glutamyl cysteine synthetase mRNA expression

predicts cisplatin resistance in head and neck cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, **40**, 75-80.

Nishitani J, Rindi G, Lopez MJ, Upchurch BH, Leiter AB (1995). Transcriptional regulation of secretin gene expression. *J Clin Gastroenterol*, **1**, 50-55.

Nishimura T, Newkirk K, Sessions RB, Andrews PA, Trock BJ, Rasmussen AA, Montgomery EA, Bischoff EK, Cullen KJ (1996). Immunohistochemical staining for glutathione S-transferase predicts response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, **2**, 1859-65.

Oakes SM, Takahashi Y, Williams MC, Joyce-Brady M (1997). Ontogeny of gamma-glutamyltransferase in the rat lung. *Am J Physiol*, **272**, 739-44.

Obrador E, Carretero J, Ortega A, Medina I, Rodilla V, Pellicer JA, Estrela JM (2002). gamma-Glutamyl transpeptidase overexpression increases metastatic growth of B16 melanoma cells in the mouse liver. *Hepatology*, **35**, 74-81.

O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, Bernard HU (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol*, **70**, 6529-39.

Odoul M, Bagrel D, Peyrieras N, Bodaud H, Siest G (1994). Glycosylation of gamma-glutamyltransferase is modified by ethanol in H5-6 hepatoma cell line. *Clin Chim Acta*, **225**, 1-15.

Oguchi H, Kikkawa F, Kojima M, Maeda O, Mizuno K, Suganuma N, Kawai M, Tomoda Y (1994). Glutathione related enzymes in cis-diamminedichloroplatinum (II)-sensitive and-resistant human ovarian carcinoma cells. *Anticancer Res*, **14**, 193-200.

Palamanda JR, Kehrer JP (1992). Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, **293**, 103-9.

Palladino MA, Hinton BT (1994). Expression of multiple gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid transcripts in the adult rat epididymis is differentially regulated by androgens and testicular factors in a region-specific manner. *Endocrinology*, **135**, 1146-56.

Pan B, Yao KS, Monia BP, Dean NM, McKay RA, Hamilton TC, O'Dwyer PJ (2002). Reversal of cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines by a c-jun antisense oligodeoxynucleotide (ISIS 10582): evidence for the role of transcription factor overexpression in determining resistant phenotype. *Biochem Pharmacol*, **63**, 1699-707.

Paolicchi A, Lorenzini E, Perego P, Supino R, Zunino F, Comporti M, Pompella A (2002). Extracellular thiol metabolism in clones of human metastatic melanoma with different gamma-glutamyl transpeptidase expression: implications for cell response to platinum-based drugs. *Int J Cancer*, **97**, 740-5.

Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, Tongiani R, De Cesare D, Mezzeti A, Dominici S, Comporti M, Pompella A (1999). Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation: a potential mechanism in atherosclerosis. *J Invest Med*, **47**, 151-160.

- Paolicchi A, Tongiani R, Tonarelli P, Comporti M and Pompella A (1997). Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *Free Radic Biol Med*, **22**, 853-860.
- Pattanaik A, Bachowski G, Laib J, Lemkuil D, Shaw CF (1992). 3rd, Petering DH, Hitchcock A, Saryan L. Properties of the reaction of cis-dichlorodiammineplatinum(II) with metallothionein. *J Biol Chem*, **267**, 16121-8.
- Pawlak A, Cohen EH, Octave JN, Schweickhardt R, Wu SJ, Bulle F, Chikhi N, Baik JH, Siegrist S, Guellaen G (1990). An alternatively processed mRNA specific for gamma-glutamyl transpeptidase in human tissues. *J Biol Chem*, **265**, 3256-62.
- Pawlak A, Lahuna O, Bulle F, Suzuki A, Ferry N, Siegrist S, Chikhi N, Chobert MN, Guellaen G, Laperche Y (1988). gamma-Glutamyl transpeptidase: a single copy gene in the rat and a multigene family in the human genome. *J Biol Chem*, **263**, 9913-6.
- Pawlak A, Wu SJ, Bulle F, Suzuki A, Chikhi N, Ferry N, Baik JH, Siegrist S, Guellaen G (1989). Different gamma-glutamyl transpeptidase mRNAs are expressed in human liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, **164**, 912-8.
- Pendyala L, Creaven PJ, Perez R, Zdanowicz JR, Raghavan D (1995). Intracellular glutathione and cytotoxicity of platinum complexes. *Cancer Chemother Pharmacol*; **36**, 271-8.
- Pendyala L, Perez R, Weinstein A, Zdanowicz J, Creaven PJ (1997). Effect of glutathione depletion on the cytotoxicity of cisplatin and iproplatin in a human melanoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*; **40**, 38-44.
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti MA, Miyashita T, Reed JC, Zunino F (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res*, **56**, 556-62.
- Portugal J, Martin B, Vaquero A, Ferrer N, Villamarin S, Priebe W (2001). Analysis of the effects of daunorubicin and WP631 on transcription. *Curr Med Chem*, **8**, 1-8.
- Rahman I, Bel A, Mulier B, Lawson MF, Harrison DJ, Macnee W, Smith CA (1996). Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **229**, 832-7.
- Rahman I (2000). Regulation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1041-9.
- Rajpert-De Meyts E, Heisterkamp N, Groffen J (1988). Cloning and nucleotide sequence of human gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8840-4.
- Ripple MO, Pickhardt PA, Wilding G (1997). Alteration in gamma-glutamyl transpeptidase activity and messenger RNA of human prostate carcinoma cells by androgen. *Cancer Res*, **57**, 2428-33.

Riva C, Lavieille JP, Schmerber S, Cuisnie O, Reyt E (2000). Phase II trial of cisplatin, 5-fluorouracil and folinic acid using a weekly 24-h infusion schedule for locally advanced head and neck cancer: a pharmacokinetic and clinical survey. *Int J Oncol*, **17**, 543-9.

Rosenblat M and Aviram M (1998). Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL : In vitro and in vivo studies. *Free Radic. Biol. Med*, **24**, 305-317.

Royall JA and Ischiropoulos H (1993). Evaluation of 2',7'-dihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*, **302**, 348-355.

Rudolph DB, Hinton BT (1997). Stability and transcriptional regulation of gamma-glutamyl transpeptidase mRNA expression in the initial segment of the rat epididymis. *J Androl*, **18**, 501-12.

Sakamuro D, Yamazoe M, Matsuda Y, Kangawa K, Taniguchi N, Matsuo H, Yoshikawa H, Ogasawa N (1988). The primary structure of human gamma-glutamyl transpeptidase. *Gene*, **73**, 1-9.

Salazar JF, Schorr H, Herrmann W, Herbeth B, Siest G, Leroy P (1999). Measurement of thiols in human plasma using liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr Sci*, **37**, 469-476.

Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd edn, Cold Spring arbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.

Sanchez-Perez I, Perona R (1999). Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin. *FEBS Lett*, **453**, 151-8.

Sasada T, Iwata S, Sato N, Kitaoka Y, Hirota K, Nakamura K, Nishiyama A, Taniguchi Y, Takabayashi A, Yodoi J (1996). Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest*, **97**, 2268-76.

Sasada T, Nakamura H, Ueda S, Iwata S, Ueno M, Takabayashi A, Yodoi J (2000). Secretion of thioredoxin enhances cellular resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Antioxid Redox Signal*, **2**, 695-705.

Sato S, Kigawa J, Minagawa Y, Okada M, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Terakawa N (1999). Chemosensitivity and p53-dependent apoptosis in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*, **86**, 1307-13.

Scanlon KJ, Kashani-Sabet M, Miyachi H, Sowers LC, Rossi J (1989). Molecular basis of cisplatin resistance in human carcinomas: model systems and patients. *Anticancer Res*, **9**, 1301-12.

Schadendorf D, Jurgovsky K, Kohlmus CM, Czarnetzki BM (1995). Glutathione and related enzymes in tumor progression and metastases of human melanoma. *J Invest Dermatol*, **105**, 109-12.

Sharma RP, Edwards IR (1983). cis-Platinum: subcellular distribution and binding to cytosolic ligands. *Biochem Pharmacol*, **32**, 2665-9.

Schafer C, Fels C, Brucke M, Holzhausen HJ, Bahn H, Wellman M, Visvikis A, Fischer P, Rainov NG (2001). Gamma-glutamyl transferase expression in higher-grade astrocytic glioma. *Acta Oncol*, **40**, 529-35.

Shen R, Chen Y, Huang L, Vitale E, Solursh M (1994). Characterization of the human MSX-1 promoter and an enhancer responsible for retinoic acid induction. *Cell Mol Biol Res*, **40**, 297-312.

Shiohara M, Akashi M, Gombart AF, Yang R, Koeffler HP (1996). Tumor necrosis factor alpha: posttranscriptional stabilization of WAF1 mRNA in p53-deficient human leukemic cells. *J Cell Physiol*, **166**, 568-76.

Selvaraj P, Balasubramanian KA (1985). Comparative structural and lectin-binding studies on gamma-glutamyltransferase from human adult liver, fetal liver and primary hepatoma. *Eur J Biochem*, **153**, 485-90.

Senturker S, Tschirret-Guth R, Morrow J, Levine R, Shacter E (2002). Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs without generation of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, **397**, 262-72.

Sharma RP, Edwards IR (1983). cis-Platinum: subcellular distribution and binding to cytosolic ligands. *Biochem Pharmacol*, **32**, 2665-9.

Shaw LM, Petersen-Archer L, London JW, Marsh E (1980). Electrophoretic, kinetic, and immunoinhibition properties of gamma-glutamyltransferase from various tissues compared. *Clin Chem*, **26**, 1523-7.

Sinha S, Hockin LJ, Neal GE (1987). Transformation of a rat liver cell line: neoplastic phenotype and regulation of gamma glutamyl transpeptidase in tumour tissue. *Cancer Lett*, **35**, 215-24.

Skretting G, Gjernes E, Prydz H (1997). Sodium butyrate inhibits the expression of the human lecithin: cholesterol acyltransferase gene in HepG2 cells by a post-transcriptional mechanism. *FEBS Lett*, **404**, 105-10.

Sodhi A, Gupta P (1986). Increased release of hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻) by murine macrophages in vitro after cis-platin treatment. *Int J Immunopharmacol*, **8**, 709-14.

Spear N, Aust SD (1995). Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation. *Arch Biochem Biophys*, **324**, 111-6.

Stark AA, Zeiger E, Pagano DA (1993). Glutathione metabolism by gamma-glutamyl-transpeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **14**, 183-189.

Sundström C and Nilsson K (1976). Establishment and characterization of human histiocytic lymphoma cell line (U937). *Int J Cancer*, **17**, 565-577.

Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P, Schubert D (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol*, **141**, 1423-32.

Tanner B, Hengstler JG, Dietrich B, Henrich M, Steinberg P, Weikel W, Meinert R, Kaina B, Oesch F, Knapstein PG (1997). Glutathione, glutathione S-transferase alpha and pi, and aldehyde dehydrogenase content in relationship to drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, **65**, 54-62.

Tate SS, Meister A (1981). gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol Cell Biochem*, **39**, 357-68.

Tew KD, Monks A, Barone L, Rosser D, Akerman G, Montali JA, Wheatley JB, Schmidt DE Jr (1996). Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol Pharmacol*, **50**, 149-59.

Toffoli G, Bevilacqua C, Franceschin A, Boiocchi M (1989). Effect of hyperthermia on intracellular drug accumulation and chemosensitivity in drug-sensitive and drug-resistant P388 leukaemia cell lines. *Int J Hyperthermia*, **5**, 163-72.

Tsutsumi M, Sakamuro D, Takada A, Zang SC, Furukawa T, Taniguchi N (1996). Detection of a unique γ -Glutamyltranspeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **23**, 1093-1097.

van den Dobbelen DJ, Nobel CS, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AF (1996). Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem*, **271**, 15420-7.

Vincent BR, Mousset S, Jacquemin-Sablon A (1999). Cysteine control over glutathione homeostasis in Chinese hamster fibroblasts overexpressing a gamma-glutamylcysteine synthetase activity. *Eur J Biochem*. **262**, 873-8.

Vincenzini MT, Marraccini P, Iantomasi T, Favilli F, Pacini S, Ruggiero M (1993). Altered metabolism of glutathione in cells transformed by oncogenes which cause resistance to ionizing radiations. *FEBS Lett*, **320**, 219-23.

Visvikis A, Pawlak A, Accaoui MJ, Ichino K, Leh H, Guellaen G, Wellman M (2001). Structure of the 5' sequences of the human gamma-glutamyltransferase gene. *Eur J Biochem*, **268**, 317-25.

Visvikis A, Thioudellet C, Oster T, Fournel-Gigleux S, Wellman M, Siest G (1991). High-level expression of enzymatically active mature human gamma-glutamyltransferase in transgenic V79 Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7361-5.

Voehringeret (1999) Bcl2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol Med*, **27**, 945-50.

Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG (1995). Gamma-glutamyltransferase : determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes. *Am. J. Epidemiol*, **142**, 699-708.

Wapnir RA, Mancusi VJ, Goldstein LA (1982). Comparative ontogenesis of gamma-glutamyl transpeptidase in rat tissues. *Experientia*, **38**, 647-8.

Wetmore LA, Gerard C, Drazen JM (1993). Human lung expresses unique gamma-glutamyl transpeptidase transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7461-5.

Whelan RD, Waring CJ, Wolf CR, Hayes JD, Hosking LK, Hill BT (1992). Over-expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro. *Int J Cancer*, **52**, 241-6.

Xia C, Hu J, Ketterer B, Taylor J B (1996). The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J*, **313**, 155-161.

Yamada M, Tomida A, Yoshikawa H, Taketani Y, Tsuruo T (1997). Overexpression of thioredoxin does not confer resistance to cisplatin in transfected human ovarian and colon cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, **40**, 31-7.

Yamaguchi H, Nagaoka K, Imakawa K, Sakai S, Christenson RK (2001). Enhancer regions of ovine interferon-tau gene that confer PMA response or cell type specific transcription. *Mol Cell Endocrinol*, **173**, 147-55.

Yao KS, Godwin AK, Johnson SW, Ozols RF, O'Dwyer PJ, Hamilton TC (1995). Evidence for altered regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression among cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, **55**, 4367-74.

Yarden A, Kimchi A (1986). Tumor necrosis factor reduces c-myc expression and cooperates with interferon-gamma in HeLa cells. *Science*, **234**, 1419-21.

Zalit I, Glass GA, Stark AA (1996). The role of chelators in the catalysis of glutathione- γ -glutamyltranspeptidase-dependent lipid peroxidation by transition metals. *Biochem Mol Biol Int*, **40**, 1123-1133.

Zhao R, Rabo YB, Egyhazi S, Andersson A, Edgren MR, Linder S, Hansson J (1995). Apoptosis and c-jun induction by cisplatin in a human melanoma cell line and a drug-resistant daughter cell line. *Anticancer Drugs*, **6**, 657-68.



Prénom, Nom : **Sandrine DAUBEUF**

Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER n° 723

Nancy, le 25 novembre 2002

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Pour le Président
et par délégation,
Le Vice-Président du
Conseil d'Administration.

Claude BURLET

Marc GABRIEL



La γ -glutamyl transférase (GGT) est une enzyme clé dans le métabolisme du glutathion (GSH), mais malgré son importance physiologique, les mécanismes de régulation de la GGT humaine sont très mal connus à cause de la complexité de son organisation génomique.

Le premier objectif de notre travail était l'étude de la régulation du gène I (seul gène codant pour une protéine active) dans différentes lignées cellulaires. Nous avons montré qu'en réponse au TPA, au butyrate de sodium, ou au $\text{TNF}\alpha$, les modulations globales des 3 messagers issus du gène I (ARNm I_A , I_B et I_C) reflètent la modulation de l'activité GGT. Cependant ces 3 ARNm sont régulés de manière indépendante et spécifique de la lignée considérée. Ces résultats montrent que les 3 ARNm issus du gène I sont probablement transcrits à partir de promoteurs indépendants, régulés différemment selon le modèle cellulaire. Nous avons ensuite étudié la régulation du promoteur B (dirigeant la transcription de l'ARNm I_B) de la GGT humaine (seul promoteur décrit à l'heure actuelle) et nous avons montré que ce promoteur est induit par le TPA dans 2 lignées cellulaires. Cette induction passe par la fixation du facteur AP1 (composé d'une sous unité cJun au moins) à l'un des 3 sites AP1 proximaux étudiés. Nous avons également montré que les séquences situées en amont de ces sites AP1 sont impliquées dans la modulation de l'induction par le TPA et dans sa spécificité cellulaire.

Enfin, nous avons localisé, cloné et partiellement caractérisé un nouveau promoteur sur le gène I humain de la GGT : celui qui dirige la transcription des ARNm I_C .

Le second objectif de notre travail était de déterminer le rôle de la GGT dans la réponse cellulaire au cisplatine (CDDP) et au carboplatine, couramment utilisés en chimiothérapie. Nous avons montré qu'une des réponses rapides des cellules HeLa à un traitement par l'un de ces agents résulte en une induction du taux de GSH intracellulaire et de l'activité GGT ce qui laisse supposer un rôle important pour la GGT dans la réponse aux dérivés du platine. Nous avons utilisé une lignée HeLa isogénique, transfectée par l'ADNc de la GGT humaine (HeLa-GGT) qui expriment l'enzyme à un niveau 10 fois supérieur à celui de la lignée parentale HeLa. Cette lignée, a permis de montrer que les cellules HeLa-GGT possèdent une résistance accrue aux CDDP et au carboplatine lorsque du GSH extracellulaire est fourni aux cellules. Dans le cas du carboplatine, la résistance est directement corrélée au taux de GSH intracellulaire. En revanche, le contenu intracellulaire en GSH ne semble pas être un facteur déterminant pour la réponse au CDDP dans notre modèle. En effet, les cellules HeLa cultivées dans un milieu complet possèdent un fort taux de GSH intracellulaire et lorsque le milieu de culture est appauvri en cystéine elles perdent plus de 80 % de leur pool (indépendamment de leur activité GGT). Or, la cytotoxicité du CDDP est comparable dans ces deux conditions de culture. Afin d'expliquer la plus grande résistance des cellules HeLa-GGT au CDDP lorsque du GSH extracellulaire est fourni, nous avons étudié le catabolisme du GSH par la GGT au niveau extracellulaire. Nous avons alors montré que le CDDP est capable d'interagir avec le produit de dégradation du GSH par la GGT : la CysGly. Ce composé est d'ailleurs plus réactif que le GSH et il forme des adduits avec le CDDP 10 fois plus rapidement que le GSH. Nous avons également été capables de détecter cet adduit dans le milieu extracellulaire des cellules HeLa-GGT incubées en présence de CDDP et de GSH.

Nous suggérons que ce mécanisme dépendant de la GGT pourrait être impliqué dans la résistance des cellules au CDDP en diminuant la quantité de CDDP disponible et/ou sa toxicité.

MOTS CLES : γ -glutamyl transférase, ARNm, Régulation, promoteur, glutathion, cisplatine, résistance.