



**HAL**  
open science

## Immunothérapie et métabolisme tumorale

Sana Belkahla Benamor

► **To cite this version:**

Sana Belkahla Benamor. Immunothérapie et métabolisme tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier; Institut supérieur de biotechnologie (Monastir, Tunisie), 2017. Français. NNT : 2017MONTT060 . tel-01690762

**HAL Id: tel-01690762**

**<https://theses.hal.science/tel-01690762>**

Submitted on 23 Jan 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.



# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par UNIVERSITE MONTPELLIER I  
UNIVERITE DE MONASTIR

Préparée au sein de l'école doctorale  
"CBS2 n°168 - Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé"  
MONTPELLIER  
"Sciences Biologiques, Biotechnologie & Santé"- MONASTIR

Et des unités de recherches  
INSERM U1040 - Institut de Médecine Régénératrice et de  
Biothérapie (I.M.R.B.)  
LR12ES07-Génome Humain et Maladies Multifactorielles

Spécialité : **Biologie Santé**

Présentée par  
**SANA BELKAHLA BENAMOR**

**Immunothérapie et Métabolisme Tumoral**

Soutenue le **11 Octobre 2017** devant le jury composé de

Mr Abderraouf **KENNANI**, Prof, Faculté de médecine de  
Monastir-TUNISIE.

**President de jury**

Mr **Alberto ANEL**, Prof, Faculté des Sciences, Département  
de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire-Zaragoza-  
ESPAGNE.

**Rapporteur**

Mme Zohra **SOUA**, Prof, Faculté de médecine de Sousse-  
TUNISIE.

**Examineur**

Mme Martine **DAUJAT**, CR, Institut de Médecine  
Régénératrice et de Biothérapie (I.M.R.B.)-FRANCE.

**Co-Directeur de thèse**

Mr Wissem **MNIF**, Prof, Institut de Biotechnologie de Sidi  
Thabet-TUNISIE.

**Co-Directeur de thèse**





### *...Remerciement...*

*Ces quelques lignes vont me permettre de remercier toutes les personnes qui m'ont beaucoup apporté au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui mon travail n'aurait pu aboutir. La difficulté tient dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Alors un grand MERCI.....*

*Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein de l'équipe "INSERM U1183 - Cellules Souches, Plasticité Cellulaire, Médecine Régénératrice Et Immunothérapies, dirigé par Monsieur Martin Villalba.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur **MARTIN VILLALBA**, pour m'avoir choisi et avoir cru en moi pour travailler sur ce projet ambitieux et très intéressant, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein de son laboratoire et en me permettant d'effectuer cette thèse. Je vous remercie de m'avoir fait découvrir et aimer la recherche durant ces quatre années. Vous m'avez laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Vous avez toujours été présent dans les moments difficiles et de stress. Pour toutes ces raisons, je considère que j'ai eu de la chance d'avoir l'encadrant qui me correspondait.*

*Je tiens à remercier le Professeur **Guillaume CARTON** d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Je tiens à remercier Pr **Alberto ANEL** et Pr **Abderraouf KENNANI** pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse.*

*Je remercie également Madame **Zohra SOUA** pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.*

*Je remercie très sincèrement Monsieur le **Wissem MNIF** co-directeur de thèse pour son aide et sa participation à ce travail. Je vous remercie pour votre confiance et votre soutien morale. J'espère être à la hauteur de votre confiance.*

*Je remercie très sincèrement Madame **Martine Daujat**, co-directrice, de thèse pour sa disponibilité, sa confiance qu'elle m'a accordé. Je vous remercie infiniment.*

*Je remercie **Abrar KHAN** et **Dang VO NGHIEM**, mes deux « inoubliables » compagnes de thèse pour leur soutien et pour leur gentillesse. Vous avez toutes mon affection. J'espère que l'avenir nous réunira à nouveau.*

*Je remercie **Nerea ALLENDE-VEGA** pour l'influence scientifique que vous avez eue sur moi. votre connaissance du sujet et nos discussions m'ont été très utile et surtout pour votre sourire permanent.*

*Je remercie très chaleureusement **Delphine Gitenay** pour ses conseils toujours avisés et pertinents. Je n'oublierai pas ton aide et tes encouragements. Je te suis très reconnaissante de m'avoir fait partager ton expérience.*

*Je remercie très tendrement **Catherine ALEXIA** pour tout ce qu'elle m'a apporté au quotidien. Merci pour ton soutien, ton aide, ta gentillesse, ta générosité et ton amour. **Delphine et Catherine** vous êtes ma famille montpelliéraine.*

*J'ai aussi une pensée pour **Amélie Cornillon**. Ce fut un vrai plaisir de travailler à vos côtés et d'avoir pu profiter de vos conseils souvent précieux. Je te suis très reconnaissant de m'avoir fait partager tes connaissances, ton savoir-faire et ton expérience.*

*Je remercie l'équipe de laboratoire LR0712 dirigé par Monsieur le Professeur **TOUHAMI MAHJOUB**.*

*Je remercie enfin tous les patients sans qui ces travaux n'auraient pas pu être menés...*

*A mes parents que je ne saurai jamais remercier assez. Je ne peux que leur dire: merci de m'avoir supportée, encouragée et d'avoir fait de moi ce que je suis.*

*Je remercie ma belle-famille et mes amis d'avoir su m'entourer au cours de ces années d'une inestimable affection.*

*et enfin à mon **mari** et ma **fille**, pour cette thèse remplie d'émotions avec une naissance et un mariage, pour leur amour, leur soutien quotidien indéfectible, leur enthousiasme pour mes travaux et pour la vie en général.*

# **-TABLE DES MATIERES-**

## **Introduction générale**

Avant propos .....	Page 1
--------------------	--------

## **CHAPITRE I : CANCER**

<b>I. Généralités</b> .....	Page 4
<b>II. Cancer de sang</b> .....	Page 5
1. Introduction .....	Page 5
a. Hématopoïèse .....	Page 7
2. La leucémie .....	Page 8
3. Lymphome .....	Page 9
4. Myélome .....	Page 9
5. Syndrome myélodysplasiques .....	Page 10
<b>III. Origines de Cancer</b> .....	Page 10
1. p53 .....	Page 11
a. La découverte de p53 .....	Page 11
2. P53 et le cancer .....	Page 11
3. p53 et Métabolisme .....	Page 12
<b>IV. Cancer et traitements</b> .....	Page 15

## **CHAPITRE II : THERAPIE CIBLÉ: "cibler le métabolisme pour combattre le cancer"**

<b>I. Généralités</b> .....	Page 16
<b>II. DCA et cancer</b> .....	Page 17

## **CHAPITRE III: LA CHIMIOOTHERAPIE**

<b>I. Introduction</b> .....	Page 23
<b>II. Les différents types de chimiothérapies</b> .....	Page 23
1. La chimiothérapie à visée curative .....	Page 23
2. Chimiothérapie adjuvante .....	Page 24
3. La chimiothérapie Palliative .....	Page 24
<b>III. La résistance à la chimiothérapie</b> .....	Page 25
1. Mécanismes pharmacocinétiques .....	Page 25
2. Mécanismes pharmacodynamiques .....	Page 26
3. Résistance multiples à la chimiothérapies (MDR) .....	Page 26
<b>IV. Les transporteurs ABC:</b>	
1. Généralités .....	Page 26
2. Structures .....	Page 27
a. Les domaines transmembranaires (TMD) .....	Page 28
b. Les domaines de liaison des nucléotides (NBD) .....	Page 28

3. Classification.....	Page 29
a. Les sous-familles de transporteurs ABC.....	Page 29
4. Substrats et modulateurs des transporteurs ABC.....	Page 31
5. Mécanisme du transport .....	Page 32
6. Implication des transporteurs ABC dans des pathologies humaines .....	Page 33
a. Hyperinsulinisme familial (ABCC8).....	Page 35
b. Syndrome de Dubin-Johnson (ABCC2) .....	Page 35
c. Adrénoleucodystrophie (ABCD1) .....	Page 36
d. Syndrome de Tangier (ABCA1) .....	Page 36
e. Anémie sidéroblastique et ataxie liées au chromosome X (ABC7) .....	Page 36
f. Cholestases intra-hépatiques progressives familiales (ABCB4) .....	Page 36
g. Syndrome de Scott (protéines ABCB1) .....	Page 36
h. Tumeurs cérébrales (ABCB1) .....	Page 37
i. Infection VIH (ABCB1) .....	Page 37

### **III. chimiorésistance et cancer .....** Page 37

1. ABCB1/MDR1/P-gp1	
a. Découverte de la Glycoprotéine-P .....	Page 38
b. Structure et topologie .....	Page 38
c. Distribution tissulaire. ....	Page 39
d. Substrats de la Glycoprotéine-P: .....	Page 40
e. Fonctions physiologiques: .....	Page 41
2. ABCC1 :	
a. Découverte de MRP1 .....	Page 42
b. Organisation structurale .....	Page 42
c. Localisations.....	Page 43
d. Fonctions physiologiques .....	Page 43
e. MRP1 et les cancers hématologiques.....	Page 45
3. ABCG2 :	
a. Découverte du transporteur .....	Page 45
b. Distribution tissulaire .....	Page 45
c. Substrats d'ABCG2 et modulation.....	Page 46
d. Implication clinique d'ABCG2 .....	Page 46
4. ABCC5:	
a. Organisation structurale .....	Page 47
b. Localisations .....	Page 47
c. Substrats des ABCC5.....	Page 48
d. Fonctions physiologiques .....	Page 48

## **CHAPITRE IV: IMMUNOTHERAPIE**

### **I.Généralités.....** Page 50

### **II. Traitements immunothérapeutiques.....** Page 50

#### **1. Molécules employées en immunothérapie.....** Page 51

### **III. Système immunitaire et cancer:**

1. Généralités .....	Page 52
2. Immunosurveillance .....	Page 54
3. Les effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	Page 56
a. Les cellules dendritiques (DC .....	Page 56
b. Les lymphocytes T.....	Page 56
c. Les lymphocytes B.....	Page 57
d. Les NKT.....	Page 57

e. Les cellules Natural Killer (NK) .....	Page 57
---	---------

## **CHAPITRE IV: LES CELLULES NK**

<b>I. Introduction</b> .....	Page 58
------------------------------	---------

<b>II. Les sous populations des cellules NK</b> .....	Page 59
---	---------

<b>III. Les fonctions effectrices des cellules NK</b> .....	Page 61
---	---------

1. La cytotoxicité.....	Page 61
-------------------------	---------

2. La production de cytokines .....	Page 62
-------------------------------------	---------

a. Les cytokines.....	Page 62
-----------------------	---------

b. Les chimiokines .....	Page 62
--------------------------	---------

<b>IV. Les récepteurs des cellules NK</b> .....	Page 63
---	---------

1. Régulation du seuil d'activation des cellules NK .....	Page 64
---	---------

2. Les récepteurs inhibiteurs .....	Page 64
-------------------------------------	---------

3. Les récepteurs activateurs .....	Page 65
-------------------------------------	---------

a. La superfamille des immunoglobulines (Ig) .....	Page 65
--	---------

b. La famille des NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) .....	Page 65
--	---------

c. La famille des lectines de type C .....	Page 66
--	---------

4. Le récepteur NKG2D (Natural-Killer group 2 D) .....	Page 66
--	---------

4.1. Les protéines MICA et MICB.....	Page 69
--------------------------------------	---------

a. Généralités.....	Page 69
---------------------	---------

b. Expression cellulaire et tissulaire des protéines MICA/B .....	Page 70
---	---------

d. MICA/NKG2D : de la reconnaissance à la lyse de la cellule cible .....	Page 71
--	---------

4.2. Les protéines ULBP .....	Page 72
-------------------------------	---------

4.3.NKG2D et pathologies immunes.....	Page 72
---------------------------------------	---------

5. Voies de signalisation activées par NKG2D .....	Page 73
--	---------

<b>Objectifs de la thèse</b> .....	Page 75
------------------------------------	---------

## **Matériels et Méthodes.....Page 77**

### **I. MATERIELS :**

1. Lignées cellulaires .....	Page 77
------------------------------	---------

2. Oligonucléotides .....	Page 78
---------------------------	---------

### **II. METHODES**

1.culture Cellulaire.....	Page 79
---------------------------	---------

2.Préparation des cellules primaires de patients et de donneurs sains, conditions de culture .....	Page 79
---	---------

3. Prolifération,viabilité et apoptose .....	Page 80
--	---------

4. Isolement des PBMC et purification des cellules NK.....	Page 80
--	---------

5. Dosage des protéines.....	Page 81
------------------------------	---------

a. Principe.....	Page 81
------------------	---------

6. Technique de Western Blot.....	Page 81
-----------------------------------	---------

7.Analyse de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel par RT-PCR .....	Page 83
--	---------

a. Principe .....	Page 83
-------------------	---------

b. Réalisation.....	Page 83
---------------------	---------

8. La PCR quantitative .....	Page 84
a. Principe .....	Page 84
b. Protocole .....	Page 87
c. Dessin des amorces .....	Page 88
d. Spécificité des amorces .....	Page 88
9. transport de Daunorubicine .....	Page 89
10. Evaluation de la toxicité des traitements .....	Page 89
11. Les études in vivo .....	Page 89
a. Traitement .....	Page 90
b. Prélèvements .....	Page 90
12. Statistiques .....	Page 90

## **RESULTATS .....** **Page 91**

Partie 1: Publication N°1 .....	Page 91
<i>Cell Metabolism Controls transcription of ABC Transporters Through the ERK5/MEF2 pathway and Depending on p53 status</i> .....	Page 91
Partie 2: .....	Page 121
<i>Tumor Metabolism Regulates Sensitivity to NK Cells</i>	
1. l'effet de DCA sur l'expression des ligands MICA, MICB et ULBP1 chez les lignées cellulaires AML .....	Page 122
2. Effet de DCA sur l'expression de MICA/B et ULBP1 est-il dépendant du statut p53 des cellules tumorales? .....	Page 126
3. La modification de l'expression des ligands MICA, MICB et ULBP1 peut-elle moduler la capacité cytotoxique des cellules NK .....	Page 129

## **Discussion .....** **Page 132**

## **Conclusion .....** **Page 142**

## **Perspectives .....** **Page 144**

## **Références bibliographiques .....** **Page 145**

# LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

## \*FIGURES\*

<b>Figure1:</b> Caractéristiques des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011) .....	<b>Page 5</b>
<b>Figure2:</b> Le Système lymphatique (Betts et al., 2013) .....	<b>Page 6</b>
<b>Figure 3:</b> Nouveaux cas estimés de leucémie, lymphome, myélome en 2014 (Institut National du Cancer, 2015) .....	<b>Page 6</b>
<b>Figure 4:</b> Epidémiologie de cancers de sang (Société Américaine de Cancer, 2014; Howlader et al., 2013) .....	<b>Page 7</b>
<b>Figure 5 :</b> Les différents compartiments de la moelle osseuse hématopoïétique (Guelfi, 1993 ; Tyler et al., 2000) .....	<b>Page 8</b>
<b>Figure 6:</b> Image histopathologique d'un myélome multiple). Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine ( Raab MS et al.,2009) .....	<b>Page 9</b>
<b>Figure 7:</b> Formule sanguine de syndrome myélodysplasique (Besa E.C.,2014) .....	<b>Page 10</b>
<b>Figure 8 :</b> Régulation cellulaire des signaux de stress médié par p53 .....	<b>Page 12</b>
<b>Figure 9:</b> Métabolisme des cellules prolifératives (Vander Heiden et al., 2009) .....	<b>Page 13</b>
<b>Figure 10:</b> Réponses de p53 durant la suppression de tumeur (Vousden and Prives,2009)....	<b>Page 13</b>
<b>Figure 11:</b> Représentation schématique des différents effets métaboliques régulés par p53 ..	<b>Page 14</b>
<b>Figure 12:</b> Dérégulation du métabolisme énergétique dans les cellules cancéreuses .....	<b>Page 16</b>
<b>Figure 13:</b> Structure de DCA .....	<b>Page 17</b>
<b>Figure 14:</b> Structure de pyruvate déshydrogénase kinase 2 (PDK2) liée au dichloroacetate (DCA) (Sutendra and Michelakis, 2013 .....	<b>Page 17</b>
<b>Figure 15:</b> Mode d'action du DCA (G.Sutendra and Evangelos D., 2013) .....	<b>Page 18</b>
<b>Figure 16:</b> Schéma représentatif de mécanismes de transports à travers la membrane .....	<b>Page 27</b>
<b>Figure 17:</b> Structure typique de l'ATP Binding Cassette (Stephan Wilkens, 2015) .....	<b>Page 28</b>
<b>Figure 18 :</b> Organisation schématique des transporteurs ABC .....	<b>Page 28</b>
<b>Figure 19:</b> Schéma illustrant les séquences consensus des domaines de liaison des nucléotides (NBD) .....	<b>Page 29</b>
<b>Figure 20:</b> Arrangement des domaines structuraux caractéristiques des transporteurs ABC des principales sous-familles (Sanchez-Fernandez et al. 2001) .....	<b>Page 31</b>
<b>Figure 21:</b> Modèle du cycle de transport des transporteurs ABC (Linton 2007) .....	<b>Page 33</b>
<b>Figure 22.</b> Structure de ABCB1 et son implication dans l'efflux extracellulaire (Aller SG., et al.,2009) .....	<b>page 38</b>
<b>Figure 23:</b> Structure 3D de la protéine p-Glycoprotéine murins (Shekfeh Suhaib, 2011) .....	<b>page 39</b>
<b>Figure 24:</b> Représentation schématique de la structures transmembranaire de la famille des ABCC (Roger Get al.,2016) .....	<b>Page 42</b>
<b>Figure 25:</b> Localisation de MRP1 dans les cellules polarisées et dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux.....	<b>Page 43</b>
<b>Figure 26:</b> Topologie membranaire de transporteur ABCG2 (Wei Mo and Jian- Ting Zhang,2011) .....	<b>Page 45</b>
<b>Figure 27:</b> Topology de ABCC5 (Singh N.,2016).....	<b>Page 47</b>
<b>Figure 28:</b> Localisation des transporteurs ABC dans une cellule polarisée.....	<b>Page 48</b>
<b>Figure 29:</b> Les différents types d'immunothérapies (Waldmann TA., 2003) .....	<b>Page 51</b>
<b>Figure 30:</b> Immunité innée et adaptative .....	<b>Page 52</b>
<b>Figure 31:</b> Les trois lignes de défense.....	<b>Page 53</b>
<b>Figure 32:</b> Les différentes phases de la réponse immunitaire anticancéreuse (Escamilla2013) .....	<b>Page 53</b>
<b>Figure 33:</b> Les trois étapes de l'immunosurveillance (Schreiber,2011;Vesely et al.,2011) ..	<b>Page 55</b>

<b>Figure 34:</b> Le développement des cellules sanguines à partir d'une cellule souche de sang pour les globules rouges et blancs(Aggarwal and Pittenger, 2005).....	<b>Page 58</b>
<b>Figure 35:</b> Modèle <i>in vivo</i> de développement des cellules NK humaines(Freud et al, 2006)	<b>Page 59</b>
<b>Figure 36:</b> Classification des cellules NK selon l'expression de CD55(Farag and Caligiuri, 2006; Poli et al., 2009) .....	<b>Page 59</b>
<b>Figure 37:</b> Représentation schématique de la différenciation des cellules NK (Montaldo et al,2013) .....	<b>page 60</b>
<b>Figure 38:</b> Les récepteurs ces cellules NK (Alvarez-Breckendrige et al.2012) .....	<b>Page 63</b>
<b>Figure 39:</b> Régulation du seuil d'activation des cellules NK .....	<b>Page 64</b>
<b>Figure 40:</b> Représentation schématique de l'action des NK contre les cellules tumorales (Lanier et al.,2001) .....	<b>Page 67</b>
<b>Figure 41 :</b> Fonctions du récepteur NKG2D exprimé par les NK, les T CD8+ et les T gamma-delta .....	<b>Page 67</b>
<b>Figure 42 :</b> Structure 3D des domaines extracellulaires de MICA(Valés-GómezM.,2015)...	<b>Page 69</b>
<b>Figure 43 :</b> Régulation de la synthèse de MICA et MICB , du gène à la protéine .....	<b>Page 70</b>
<b>Figure 44 :</b> Structures et affinités des différents ligands de NKG2D .....	<b>Page 72</b>
<b>Figure 45 :</b> Voies de signalisation impliquées dans l'activation des NK.....	<b>Page 74</b>
<b>Figure 46:</b> Schéma représentatif des étapes de marquage de wersternBlot .....	<b>Page 82</b>
<b>Figure 47:</b> Les différentes étapes aboutissant à l'analyse des données de PCR en temps réel.	<b>Page 86</b>
<b>Figure 48:</b> appareil LightCycler 480 .....	<b>Page 87</b>
<b>Figure 49:</b> modofication du metabolisme cellulaire dans les cellules cancreuses .....	<b>Page 137</b>

### \*TABLEAUX\*

<b>Tableau 1:</b> Thérapies des cancers d'origine ectodermale (Kankotia and Stacpoole, 2014) ...	<b>Page 20</b>
<b>Tableau 2:</b> Thérapies des cancers d'origines endodermes (Kankotia and Stacpoole, 2014)	<b>Page 21</b>
<b>Tableau 3:</b> Thérapies des cancers d'origine mesodermes (Kankotia and Stacpoole, 2014).	<b>Page 22</b>
<b>Tableau 4:</b> Classement des anticancéreux selon leur mode d'action physiologique .....	<b>Page 25</b>
<b>Tableau 5:</b> Substrats des principaux transporteurs ABC .....	<b>Page 31</b>
<b>Tableau 6:</b> Modulateurs des principaux transporteurs ABC.....	<b>Page 32</b>
<b>Tableau 7:</b> Rôle pharmacologique des transporteurs ABC (Szakacs, G et al.2006) .....	<b>Page 34</b>
<b>Tableau 8:</b> Les transporteurs ABC humains et leurs maladies associées(Schmitz et al.2006).	<b>Page35</b>
<b>Tableau 9:</b> Localisation et fonctions physiologiques possibles de la p-Glycoprotéine .....	<b>Page 40</b>
<b>Tableau 10:</b> Substrats de la glycoprotéine-P .....	<b>Page 40</b>
<b>Tableau 11:</b> Substrat , inhibiteurs et modulateurs de ABCB1 .....	<b>Page 41</b>
<b>Tableau 12:</b> Substrats et inhibiteurs d'ABCG2 .....	<b>Page 46</b>
<b>Tableau 13 :</b> Maladies associées aux transporteurs ABC .....	<b>Page 49</b>
<b>Tableau 14 :</b> Caractérisations des cellules NK CD56 <sup>Bright</sup> et CD56 <sup>dim</sup> .....	<b>Page 61</b>
<b>Tableau 15:</b> Les récepteurs des NK ,leurs ligands et leur expression(Montaldo et al.,2013).	<b>Page 68</b>
<b>Tableau 16:</b> Liste des amorces utilisés.....	<b>Page 78</b>

## Abbreviations

**ABC protéines** A Tl'-binding-casseue protéines  
**ADN, ARN** : acide désoxyribonucléique ou ribonucléique  
**Aff** Apoptosis inducingfactor  
**ARA protein** : Anthracycline Resistance Associatedprotein  
**AMP-c** adénine monophosphate-cyclique  
**AT-MOR**: altered multidrug resistance  
**ADCC** Antibody dependent cellular cytotoxicity  
**AIF** Apoptosis-inducing factor  
**ALL** Acute lymphoid leukemia  
**AML** Acute myeloid leukemia  
**AMPK** 5' adenosine monophosphate-activated protein kinas  
**APC** Antigen presenting cell  
**ATCC** American Type Culture Collection  
**ATP** Adenosine triphosphate  
**BCL** B-cell lymphoma  
**B-CLL** B-cell chronic lymphocytic leukemia  
**CCR** Chemokine receptor  
**CD** Cluster of differentiation  
**CLL** Chronic lymphocytic leukemia  
**CML** Chronic myeloid leukemia  
**CTL** Cytotoxic T lymphocyte  
**DC** Dendritic cell  
**DCA** Dichloroacetate  
**Fc** Fragment crystalline  
**GM-CSF** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor Graft-  
**HCMV** Human Cytomegalovirus  
**HCT** Hematopoietic Cell Transplantation  
**HL** Hodgkin Lymphoma  
**HLA** Human leukocyte antigen  
**HSC** Hematopoietic stem cell  
**HSCT** Hematopoietic stem cell transplantation  
**ICAM** Intercellular adhesion molecule  
**IFN  $\gamma$**  Interferon gamma  
**Ig** Immunoglobulin  
**IL** Interleukin  
**IMiDs** Immunomodulatory drugs  
**ITAM** Immunoreceptor tyrosine-based activation motif  
**ITIM** Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs  
**KIR** Killer immunoglobulin-like receptor  
**KLRG** Killer cell lectin-like receptor G  
**LAL** : leucémie aiguë lymphoblastique  
**LAM** : leucémie aiguë myeloblastique  
**LFA** Leukocyte functional antigen  
**LIR** Leukocyte immunoglobulin-like receptor  
**LTNP** Long-term non-progressor  
**mAb** Monoclonal antibody  
**MAP kinase** : *Pitogen Activating Kinase*  
**MDR** : *multidrug resistance*  
**MCMV** Murine Cytomegalovirus  
**MDS** Myelodysplastic Syndrome  
**MHC** Major Histocompatibility complex  
**MIC** MHC class I chain related protein  
**MM** Multiple myeloma  
**MULT1** : UL16)binding protein-like transcript 1)

**Nef** Negative factor  
**NHL** Non-Hodgkin lymphoma  
**NK** Natural killer  
**NKG2D** : natural-killer group 2, member D  
**NKG2DL**: natural-killer group 2, member D ligands  
**NFκB** : nuclear factor-kappa B  
**NCR** Natural cytotoxicity receptors  
**PAMP** Pathogen-associated molecular patterns  
**PBL** Peripheral blood lymphocytes  
**PBMC** Peripheral blood mononuclear cell  
**PDH** Pyruvate dehydrogenase  
**PDK1** Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1  
**P-gp** : *permeability-glycoprotein*  
**PGC1α** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α  
**PI3K** Phosphoinositide 3-kinase  
**PNT** Peroxynitrite  
**PRR** Pattern recognition receptors  
**PUMA** p53 upregulated modulator of apoptosis  
**ROS** Reactive oxygen species  
**S.E.** Standard error  
**SLL** Small lymphocytic lymphoma  
**TAA** Tumor associated antigen  
**TCA** Tricarboxylic acid cycle  
**TCR** T cell receptor  
**TGF** Tumor growth factor  
**Th1** Type 1 T helper cell response  
**Th2** Type 2 T helper cell response  
**TLR** Toll-like receptor  
**TNF** Tumor necrosis factor  
**TRAIL** TNF-related apoptosis inducing ligand  
**UCB** Umbilical Cord Blood  
**ULBP** : UL16-binding proteins  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

## Abstract

Tumorigenesis is caused by a series of defects that occur within the cancer cell and its microenvironment. These abnormalities allow the tumor cell to develop its own strategies for growth, proliferation, differentiation and metabolism. In the last, cancer cells favor lactic fermentation instead of oxidative phosphorylation OXPHOS (respiration). This metabolic adaptation is called the Warburg effect.

We proposed an innovative therapeutic concept based on the induction of metabolic changes by the use of dichloroacetate (DCA) and this is associated with immunotherapy using activated NK cells. DCA, a pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) inhibitor, induces the activation of pyruvate dehydrogenase (PDH), responsible for the catalysis of pyruvate to acetylcoenzyme A (Ac-CoA), promoting the oxidation of glucose/pyruvate in the mitochondria. DCA has been used for a long time as a cholesterol-lowering and anti-lactic acidosis therapy. My team has previously shown that the metabolic change allows tumor cells to escape the immune response. I have observed that DCA treatment induced a high upregulation of mRNA and protein expression of the stress ligands MICA, MICB and ULBP1. These are recognized by the NK cell activating receptor NKG2D, inducing a NK cell-mediated cytotoxic response against tumor cells. DCA-induced expression of these stress ligands depends on wtp53 expression on the tumor cell.

On the other hand, we evaluated the effect of DCA on the expression of ABC carriers, which intervene in the efflux of anticancer agents used in chemotherapy. The expression of ABC carriers is strongly related to drug resistance phenotypes. We observed that DCA causes a decrease in the expression of ABCB1, ABCC1, ABCC5 and ABCG2 in wtp53 cells while it induces an increase in mutantp53 or nullp53 cells. Conversely, DCA-induced accumulation of antitumor drugs, i.e. daunorubicin, and favors chemotherapy-induced tumor death only in wtp53-expressing cancer cells. The promoters of these ABC transporters and the stress proteins presented above contain several binding sites specific to the transcription factor MEF2, which is the target of ERK5. We have found that in addition to the ability to change tumor metabolism, DCA modifies the expression ABCB1, ABCC1, ABCC5 and ABCG2 by activation of the ERK5 / MEF2 pathway. These results are confirmed in various cell lines, in cells derived from patients and in an in vivo model.

**Key words:** cancer, metabolism, Warburg effect, dichloroacetate, Natural Killer  
,chemoresistance, ABC transporters

## Résumé

La formation et le développement d'une tumeur sont provoqués par une série de défauts qui se produisent à l'intérieur de la cellule cancéreuse et dans son microenvironnement. Ces anomalies permettent à la cellule de développer ses propres stratégies de croissance, de prolifération, de différenciation et de métabolisme.

La modification du métabolisme respiratoire est l'une des stratégies utilisée par les cellules cancéreuses favorisant la fermentation lactique au lieu de la phosphorylation oxydative OXPHOS (respiration). Cette adaptation métabolique porte le nom d'effet Warburg.

Nous avons proposé un concept thérapeutique novateur basé sur l'induction de changements métaboliques par l'utilisation de dichloroacétate (DCA) associée avec l'immunothérapie en utilisant les cellules NK activées. Le DCA, molécule inhibitrice de la PDK, induit l'activation de la PDH, responsable de la catalyse de pyruvate en Acétylcoenzyme A (Ac-CoA), favorise alors l'oxydation du glucose dans la mitochondrie. Le DCA a déjà été utilisé depuis longtemps comme traitement hypocholestérolémiant et bloquant l'acidose lactique. Notre équipe a montré auparavant que le changement métabolique permet aux cellules tumorales d'échapper à la réponse immune.

Nous avons observé que le traitement par DCA induisait, dépendant du phénotype p53, une forte up-régulation de l'expression du ARNm et des protéines de stress MICA, MICB et ULBP1, ligands spécifiques des récepteurs activateurs NKG2D des cellules NK induisant alors une réponse cytotoxique contre les cellules tumorales.

D'autre part nous avons évalué l'effet de DCA sur l'expression des transporteurs ABC qui interviennent dans l'efflux des agents anticancéreux utilisés dans la chimiothérapie. L'expression des transporteurs ABC était fortement liée aux phénotypes de chimiorésistance. Nous avons bien confirmé que le DCA provoque une diminution de l'expression des transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC5 et ABCG2 dans les cellules wtp53 alors qu'il induit une augmentation d'expression dans les cellules mutantp53 ou nullp53.

Les promoteurs des transporteurs et les protéines de stress étudiés comportent également plusieurs sites de liaison spécifique au facteur de transcription MEF2, qui est la cible d'ERK5. Nous avons bien constaté qu'en plus de sa capacité de changer le métabolisme tumorale, le DCA modifie l'expression des transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC5 et ABCG2 par l'activation de la voie ERK5/MEF2. Ces résultats sont confirmés dans diverses lignées cellulaires, ainsi que dans des cellules issues de patients et dans un modèle *in vivo*.

**Mots clés : cancer, métabolisme, Effet Warburg, l'acide dichloroacétique (DCA), cellules NK, chimiorésistance, les transporteurs ABC**





# Introduction

## AVANT PROPOS

Dans notre société actuelle, le cancer forme un enjeu de santé publique fort puisque plus de un tiers des décès masculins et un quart des décès féminins lui sont dus avec environ 17,1 millions le nombre de nouveaux cas en 2014.

Le cancer est une maladie grave qui se traduit par une série de défauts qui se produisent à l'intérieur de la cellule aboutissant à une perturbation de la communication cellulaire, associée à une absence de mort cellulaire, engendrant le développement d'amas de cellules cancéreuses (appelé tumeur) qui échappent aux règles de fonctionnement du corps.

La cellule cancéreuse est donc une cellule dérégulée qui se multiplie de façon anarchique donnant naissance à des tumeurs de plus en plus grosses qui se développent en envahissant puis détruisant les zones qui les entourent. En détruisant son microenvironnement, le cancer peut devenir un réel danger pour la survie de l'être vivant.

Les avancées récentes dans le diagnostic et la disponibilité de divers traitements destinés contre certains cancers, ont permis de diminuer remarquablement l'incidence de décès dans le monde et d'améliorer la qualité de vie des patients.

Cependant, Malgré les progrès thérapeutiques, le cancer forme encore un problème public suite aux nombres d'échecs liés à certains types de traitements.

Bien que la chimiothérapie occupe une place considérable dans le traitement des cancers, notamment pour ceux qui ne peuvent pas être traités par chirurgie ou radiothérapie, comme les lymphomes, leucémies et tumeurs métastatiques. Malheureusement, très peu parmi les patients traités auront une rémission prolongée à cause de la résistance fréquente des cellules cancéreuse à la chimiothérapie.

Cette chimiorésistance résulte souvent de la présence d'un système d'efflux capable de diminuer la concentration intracellulaire de nombreux médicaments, diminuant ainsi leur activité.

Ce mécanisme de résistance est conféré à des transporteurs (protéines) membranaires, membres de la superfamille des transporteurs ABC notamment les transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC5 et ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein).

Les deux grandes approches utilisées à ce jour pour tenter de pallier la résistance aux agents anticancéreux sont :

- \* La recherche de nouvelles drogues ayant une forte toxicité cellulaire ou des drogues qui ciblent sélectivement les cellules cancéreuses.
- \* La recherche d'inhibiteurs de l'efflux des drogues, qui sont des composés à utiliser en combinaison avec des anticancéreux, afin de resensibiliser la cellule aux traitements.

Malgré ces tentatives thérapeutiques pour "corriger" la chimiorésistance, aucun traitement fiable n'est disponible sur le marché. Dans ce contexte, plusieurs équipes ont orienté leurs attentions à d'autres méthodes puisque les thérapies courantes mises en place comme la chimiothérapie ou la radiothérapie révèlent souvent des effets limités, ce qui met en évidence la nécessité du développement de nouvelles approches pour le traitement des cancers.

Dans ce contexte, cibler le système immunitaire, paraît une cible prometteuse puisqu'il est capable de neutraliser les cellules transformées sans aucun effet néfaste sur les cellules saines.

L'immunité, en tant que « *la science de la défense contre le non-soi dans le respect de soi* » (Jean Dausset, immunologiste français, prix Nobel en 1980 pour sa découverte en 1958 du complexe majeur d'histocompatibilité), assure un rôle crucial dans l'élimination des agents pathogènes. Depuis peu de temps plusieurs recherches ont suggéré que l'immunothérapie est devenue l'une des voies de recherches majeures pour combattre le cancer et elle consiste à stimuler le système immunitaire pour tuer les cellules tumorales et empêcher leurs proliférations. Divers résultats ont suggéré que les cellules Natural Killer (NK), peuvent être utilisées en tant qu'une thérapie naturelle pour lutter contre le cancer. Les cellules NK sont des lymphocytes de l'immunité innée, représentant 10 à 15% des lymphocytes circulants impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales ou infectées par des pathogènes intracellulaires.

Depuis la découverte de la théorie de l'immunosurveillance en 1957 par Burnet et Thomas, le monde scientifique s'est efforcé d'identifier les cellules immunitaires impliquées dans ce processus. Les cellules NK constituent donc une composante majeure de l'immuno-surveillance innée dans plusieurs cancers hématologiques et solides. L'activité des lymphocytes NK passe principalement par une grande variété de récepteur avec un rôle activateur ou inhibiteur. Parmi les récepteurs activateurs présents à la surface des lymphocytes NK, le récepteur NKG2D qui a un rôle majeur dans la toxicité directe contre la cellule cible grâce à sa capacité d'interagir avec divers types de ligands (tel que MICA, MICB, ULBP1) exprimés sur la surface des cellules tumorales.

Au cours de notre travail, nous avons essayé d'améliorer les résultats obtenues par les traitements classiques dirigés contre le cancer (Immunothérapie et chimiothérapie) par l'utilisation d'une molécule pharmacologique utilisé depuis longtemps dans le traitement de l'acidose lactique congénitale. Il s'agit donc d'une molécule générique (non brevetable et peu coûteuse) relativement non-toxique.

Le cardiologue Evangelos Michelakis et son équipe croient que le DCA pourrait bientôt être utilisé efficacement pour traiter de nombreuses formes de cancer puisque en 2007, le professeur E. Michelakis a montré que le DCA entraîne la régression de plusieurs cancers, notamment ceux du poumon, du sein et les tumeurs cérébrales.

Le présent travail est divisé en quatre chapitres, le premier est une synthèse bibliographique dans laquelle nous avons étudié deux traitements couramment utilisés (la chimiothérapie et l'immunothérapie); nous avons décrit d'abord les mécanismes de la chimiorésistance et l'implication des transporteurs ABC dans l'échec de traitement chimiothérapeutique et ensuite nous avons décrit les mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour échapper à l'immunosurveillance.

Le deuxième chapitre comprend une description du matériel et des méthodes utilisés pour la réalisation de ce présent travail.

Le troisième chapitre comporte les résultats qui ont fait l'objet de deux publications.

Le quatrième est dernier chapitre clôture ce manuscrit par une discussion générale des résultats obtenus et les perspectives.

---

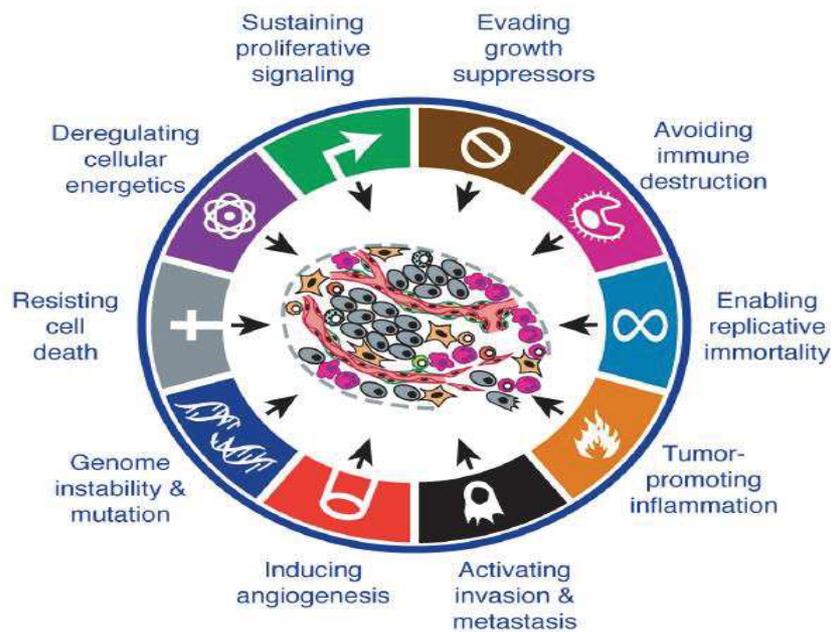
**CHAPITRE1 : CANCER****I- Généralités :**

Le cancer est le résultat d'une division incontrôlée des cellules qui acquièrent une capacité importante de s'infiltrer à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques ou sanguins et perdent tous les systèmes de régulation de la division. Le cancer est donc une maladie chronique, possiblement mortelle, probablement liée à des mutations des gènes dont des altérations des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs ont été largement documentés dans la genèse du cancer (**Dean, 1998 ; He et al., 2007**).

Au cours des 30 dernières années, il a été établi que la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale est le résultat d'un processus qui se déroule en plusieurs étapes, avec de multiples mutations génétiques des cellules qui les permettent de s'échapper aux contrôles cellulaires. Il est également bien documenté que le développement du cancer dépend de changements dans l'environnement et les interactions entre les cellules tumorales et les cellules normales (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

Les principales caractéristiques des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales sont au nombre de 10 comme décrit dans la revue de Hanahan et Weinberg (2011). Ces dix caractéristiques sont décrites comme suit (**figure 1**) :

1. Le maintien de la prolifération cellulaire: Les cellules se reproduisent sans cesse et sont insensibles aux signaux d'arrêt de croissance en provenance des cellules voisines
2. L'échappement des signaux des suppresseurs de croissance
3. La résistance à la mort cellulaire
4. L'immortalisation répliquative : Le processus d'apoptose ou de « suicide » cellulaire, qui se déclenche normalement lorsqu'une cellule est dérégulée, ne fonctionne plus
5. L'induction d'angiogenèse : La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, appelée angiogenèse tumorale : Ces vaisseaux sont indispensables à la croissance des tumeurs, car ils leur apportent des nutriments et de l'oxygène (sinon, les tumeurs ne peuvent croître au-delà de 1 mm)
6. L'activation de l'invasion et de la formation de métastases
7. La reprogrammation du métabolisme énergétique
8. L'échappement au système immunitaire
9. L'instabilité génique.
10. L'environnement inflammatoire promu par le cancer (**Hanahan et Weinberg, 2011**).



**Fig.1: Caractéristiques des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2011).**

## II- Cancer de sang:

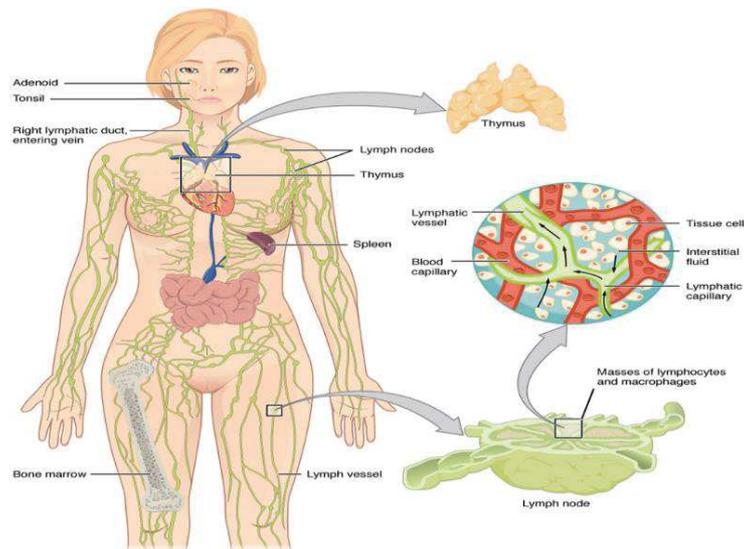
### 1-Introduction:

Les cancers hématologiques ou cancer de sang sont des cancers développés à partir de cellules du sang : globules blancs, globules rouges et plaquettes. Ils sont dus à des altérations de ces cellules à différents stades de leur maturation: altération de l'hématopoïèse.

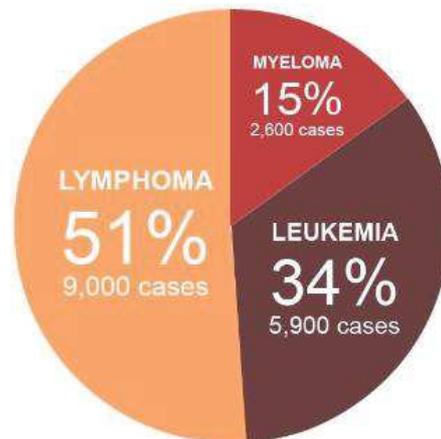
On distingue 3 grandes familles de cancers du sang :

- les leucémies, caractérisées le plus souvent par la présence de cellules anormales circulant dans le sang ;
- les myélomes, qui se manifestent notamment par des lésions osseuses,
- et les lymphomes, qui touchent principalement les ganglions est le type de cancer le plus présent (**figure 2 et figure 3**) (Betts et al., 2013).

Des études statistiques américaines ont comparé l'évolution de nombre de nouveaux cas de différents types de cancers de sang, ils ont pu conclure que grâce aux progrès thérapeutiques la survie des sujets atteints de cancers a augmenté durant les dernières années (**figure 4**).



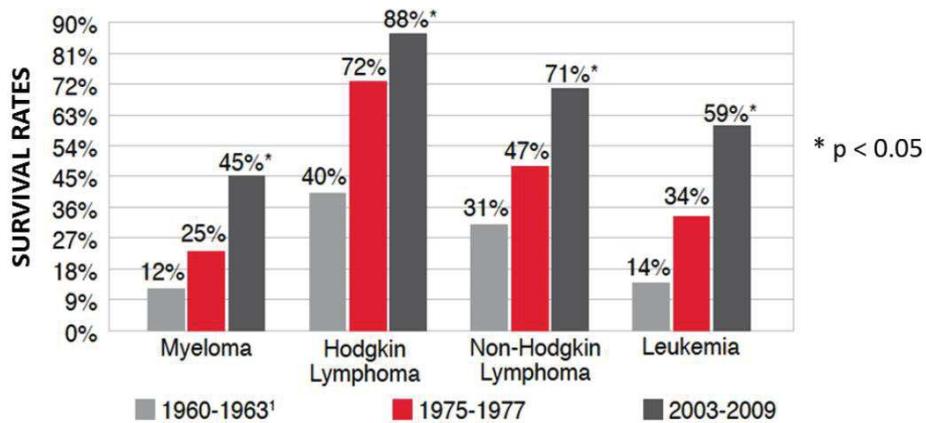
**Fig.2:** Le Système lymphatique (Betts et al., 2013).



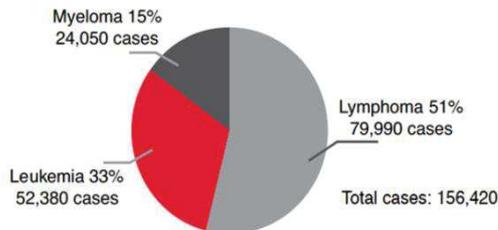
**Fig. 3:** Nouveaux cas estimés de leucémie, lymphome, myélome en 2014 (Institut National du Cancer, 2015).

**A.**

**Five-Year Relative Survival Rates by Year of Diagnosis**

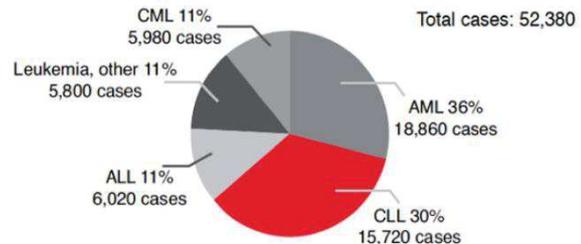


**B. Estimated New Cases of Leukemia, Lymphoma and Myeloma in 2014\***



\* Total % does not add up to 100% due to rounding in the calculation individual percentages.

**C. Estimated Proportion of New Cases (%) in 2014 for Types of Leukemia, in Adults and Children\***



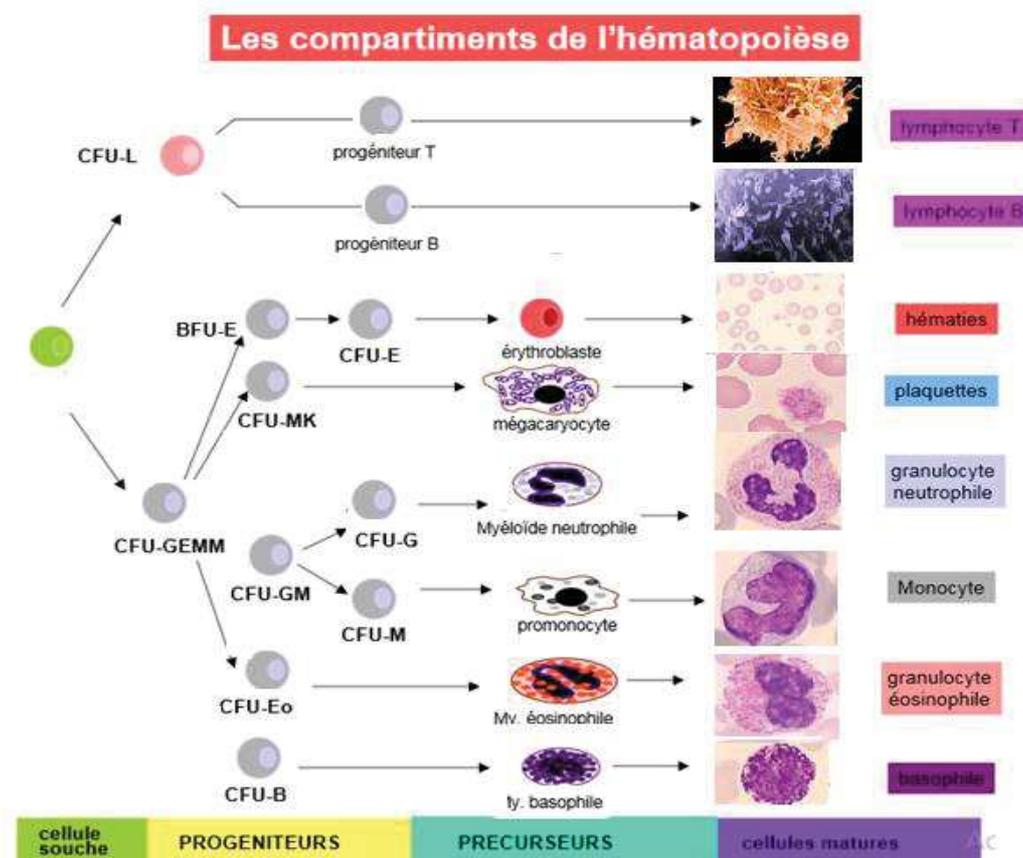
\* Total is less than 100% due to rounding in the calculation individual percentages.

**Fig. 4: Epidémiologie de cancers de sang au Etats Unis. (Société Américaine de Cancer, 2014; Howlader et al., 2013).**

**a-Hématopoïèse:**

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au renouvellement continu et régulé des cellules sanguines (Guelfi, 1993 ; Tyler et al., 2000).

Cette activité de production a pour origine une cellule souche commune totipotente qui va se différencier vers la voie myéloïde ou vers la voie lymphoïde. Dans le premier cas, elle va donner des progénitures qui se différencieront vers les cellules myéloïdes (les globules rouges, plaquettes, granulocytes et monocytes). Dans le deuxième cas, la différenciation aboutira aux lymphocytes (figure 5). L'hématopoïèse doit être contrôlée afin de maintenir à peu près constant le nombre de cellules sanguines malgré des variations de consommation importantes liées à des circonstances physiologiques (infections, hémorragies...). Cette régulation repose sur des mécanismes cellulaires et humoraux (facteurs de croissance, interleukines) qui peuvent être stimulateurs ou inhibiteurs de l'hématopoïèse.



**Fig. 5 :** Les différents compartiments de la moelle osseuse hématopoïétique (Guelfi, 1993 ; Tyler et al., 2000).

## 2- La leucémie:

La leucémie, du grec leukos, (blanc) et haima (sang), est un cancer qui prend naissance dans la moelle osseuse et caractérisé par une accumulation incontrôlée de cellules souches de sang appelé blastes. Ce type de cancer favorise la fabrication d'un grand nombre de globules blancs, ce qui affaiblit le système immunitaire. À cause de cette croissance anarchique, les globules blancs n'ont pas assez de temps pour se développer pleinement et ne fonctionneront pas bien ou interféreront avec la production d'autres globules blancs.

Il existe différents types de leucémies qui sont classées:

- Selon le type de globules blancs touchés et leur stade de maturation on distingue:

La leucémie lymphoïde ou myéloïde.

- Selon l'évolution de la maladie on distingue:

\* **La leucémie aigüe:** caractérisée par une prolifération accrue et anarchique des cellules immatures du sang non fonctionnelles, ayant une histologie anormale. Un traitement rapide est requis immédiatement pour éviter la diffusion de ces cellules aux organes.

\***La leucémie chronique**: les cellules cancéreuses de ce type de leucémie sont plus matures, bien que toujours anormales et passant dans le sang, l'évolution se fait sur des mois voire sur des années (**Burke et Startzell, 2008**).

### 3- Lymphome:

Le lymphome est un cancer du système lymphatique qui se développe aux dépend des lymphocytes qui assurent un rôle important dans la défense immunitaire.

Selon leur nature on distingue deux types de lymphome : le lymphome non Hodgkinien (LNH) et la maladie de Hodgkin. Ce qui les différencie est la présence spécifique de cellules de Reed-Sternberg dans le cas de la maladie de Hodgkin.

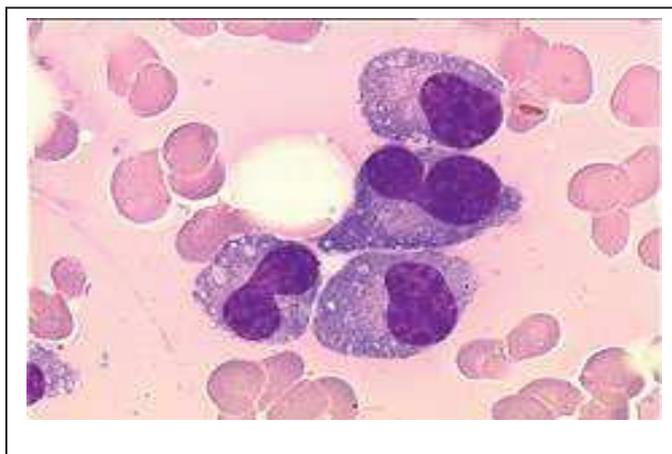
Selon leur degré de malignité, on les classe en deux groupes généraux :

- Les formes agressives : Il s'agit des formes évoluant très rapidement. Elles touchent entre 50 et 60% des patients affectés par un lymphome. C'est le cas du lymphome de Burkitt et du lymphome du manteau.
- Les formes indolentes : Leur évolution est plus lente et peut se faire sur plusieurs années. Elles représentent 40 à 50% des personnes concernées par la maladie. Cela regroupe par exemple le lymphome folliculaire ou le lymphome du MALT.

### 4- Myélome:

Le myélome, encore appelé myélome multiple ou maladie de Kahler est caractérisé par la multiplication, dans la moelle osseuse, de certaines cellules de la famille des globules blancs (lymphocytes B) chargées de la formation d'anticorps, appelées plasmocytes (**figure 6**).

La production de globules rouges et de globules blancs sains est diminuée, les os deviennent douloureux et fragiles. Le terme «multiple» provient du fait que ce cancer atteint souvent plusieurs os.

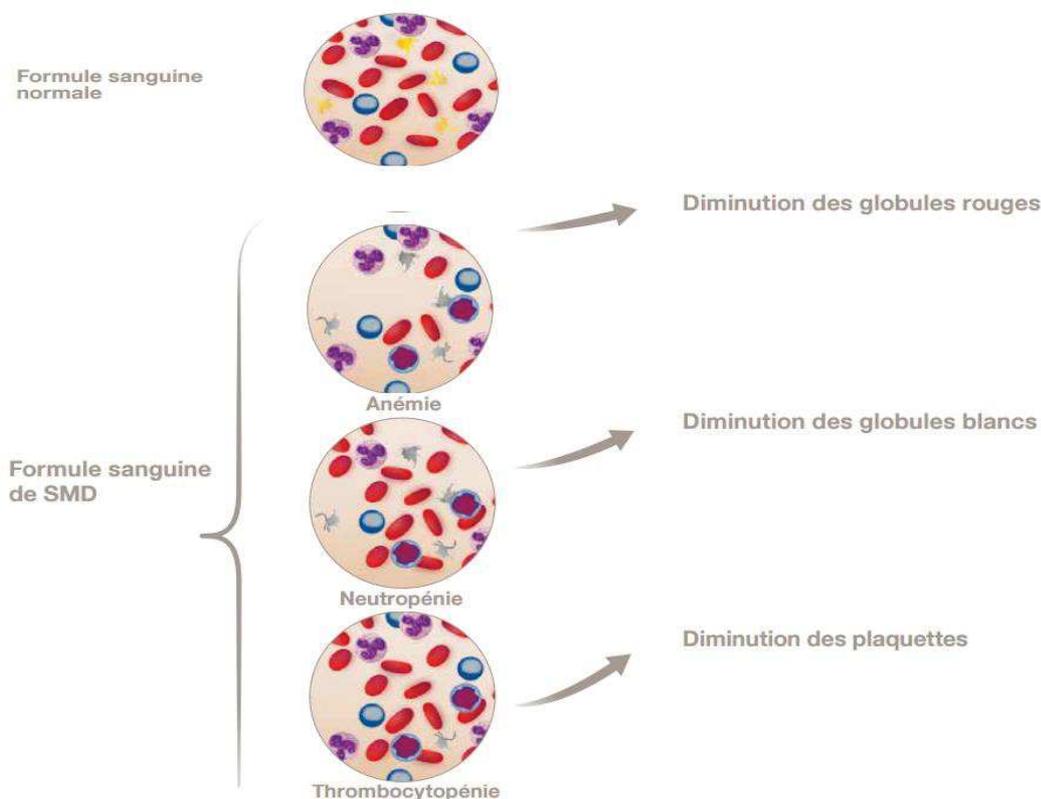


**Fig. 6:** Image histopathologique d'un myélome multiple). Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine ( Raab et al., 2009).

### 5-Syndrome myélodysplasiques:

Le terme de syndrome myélodysplasique (SMD) englobe tout un groupe de maladies clonales des cellules souches hématopoïétiques, généralement acquises, rarement congénitales, ayant une présentation clinique hétérogène qui conduit à une insuffisance de production médullaire qualitative : hématopoïèse inefficace ou dyshématopoïèse.

Un SMD est caractérisé, sur l'hémogramme, par des cytopénies périphériques avec une moelle osseuse riche où s'accablent des cellules à la morphologie anormale (= dysplasiques) (**figure 7**) et aux capacités de proliférations et de différenciations altérées. Les cellules dysplasiques présentent également des anomalies fonctionnelles (ex : neutrophiles ou plaquettes inefficaces).



**Fig. 7: Formule sanguine de syndrome myélodysplasique (Besa, 2014).**

### III - Origines de Cancer :

Les causes de l'apparition des tumeurs ont longtemps été mal connues. Même si Boveri avait très tôt émis l'hypothèse qu'elles pouvaient être dues à des problèmes génétiques (**Boveri, 1914**), on savait également que dans certains cas elles pouvaient être héréditaires. L'analyse mathématique faite par Knudson à partir de différentes données cliniques de patients atteints de rétinoblastome lui a permis d'établir le dogme du développement du cancer : il faut deux événements mutationnels ("the two

hits hypothèses") (**Knudson, 1971**). Cette théorie était annonciatrice de la découverte des gènes suppresseurs de tumeur. Il existe plusieurs gènes qui interviennent dans la suppression de tumeur dont p53 est le plus étudié (**Muller et Vousden, 2013**).

### 1- p53:

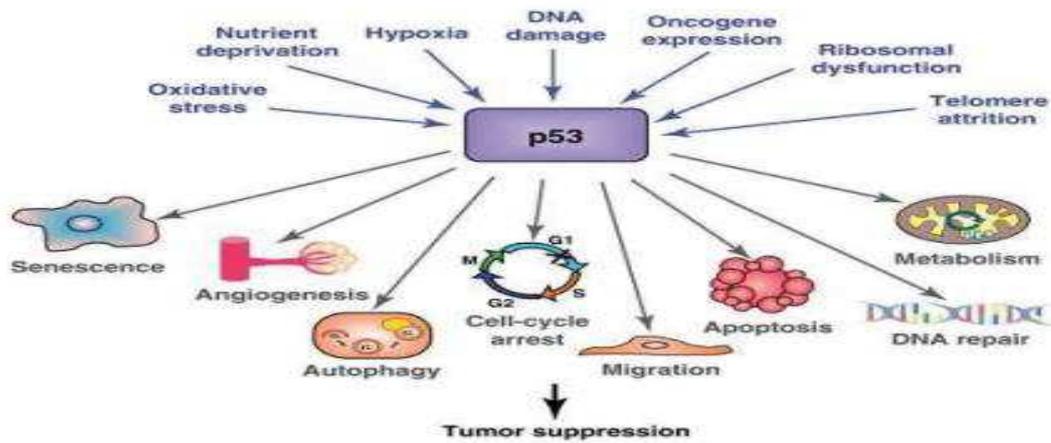
#### **a- La découverte de p53 :**

p53 est une protéine de 393 acides aminés et de 53kDa qui, dans les premières études à son sujet, n'était détectée dans les cellules qu'après l'induction de leur transformation. Ainsi p53 a été observée pour la première fois en 1979 en tant qu'antigène spécifique de certains sarcomes induits chimiquement dans les souris (**DeLeo et al., 1979**). La protéine p53 a d'abord été décrite comme une protéine nucléaire (**Dippold et al., 1981**) mais par la suite il a été montré que cette protéine est cytoplasmique dans les cellules normales et est transloquée au noyau dans les cellules transformées (**Rotter et al., 1983**). En 1981, le rôle de p53 dans la régulation de la division cellulaire et son altération dans les cellules cancéreuses devient évident (**Dippold et al., 1981**).

### 2 - P53 et le cancer:

p53 est aujourd'hui considérée comme le "gardien de génome" impliqué dans la suppression de tumeur (**figure 8**) car il est le gène le plus souvent muté dans les cancers (plus de 50% de la totalité des cancers : voir la banque de données IARC [www-p53.iarc.fr/index.html](http://www-p53.iarc.fr/index.html)). Les mutations de p53 favorisent la capacité proliférative des cellules (**Vousden et Prives, 2009**) puisqu'elles ne sont plus réprimées au niveau de leur croissances. Malgré son rôle majeur dans la cellule, des lignées cellulaires dépourvues de p53 ont été décrites, indiquant que la cellule peut survivre même en absence de ce gène. La protéine p53, depuis longtemps, était associée avec la survenue de cancer puisque les souris KO pour p53 sont plus susceptibles au développement de tumeurs (**Donehower et al., 1992**). En raison de son rôle en tant que gène suppresseur de tumeur, on a pensé à la réintroduction de p53 dans des cellules tumorales. La transfection de p53 dans des cellules transformées induit un arrêt de leur proliférations dû à un blocage en phase G1 (**Mercer et al., 1990; Michalovitz et al., 1990**) ou une entrée en apoptose (**Yonish-Rouach et al., 1991**), mais parfois dans certaines cellules aucun de ces effets n'est visible (**Shaulsky et al., 1991; Cheng et al., 1992**).

Malgré les nombreuses études menées depuis longtemps à son sujet, les thérapies anticancéreuses reposant sur la "réparation" de la protéine p53 dans les cellules tumorales soit par des essais de restauration de la fonction de p53 (ajout de p53 WT ou modification de p53 mutante de manière à lui donner une activité sauvage), soit en cibler et inactiver les cellules déficientes en p53, ont montré des résultats intéressants mais que ne sont pas disponibles à l'heure actuelle.

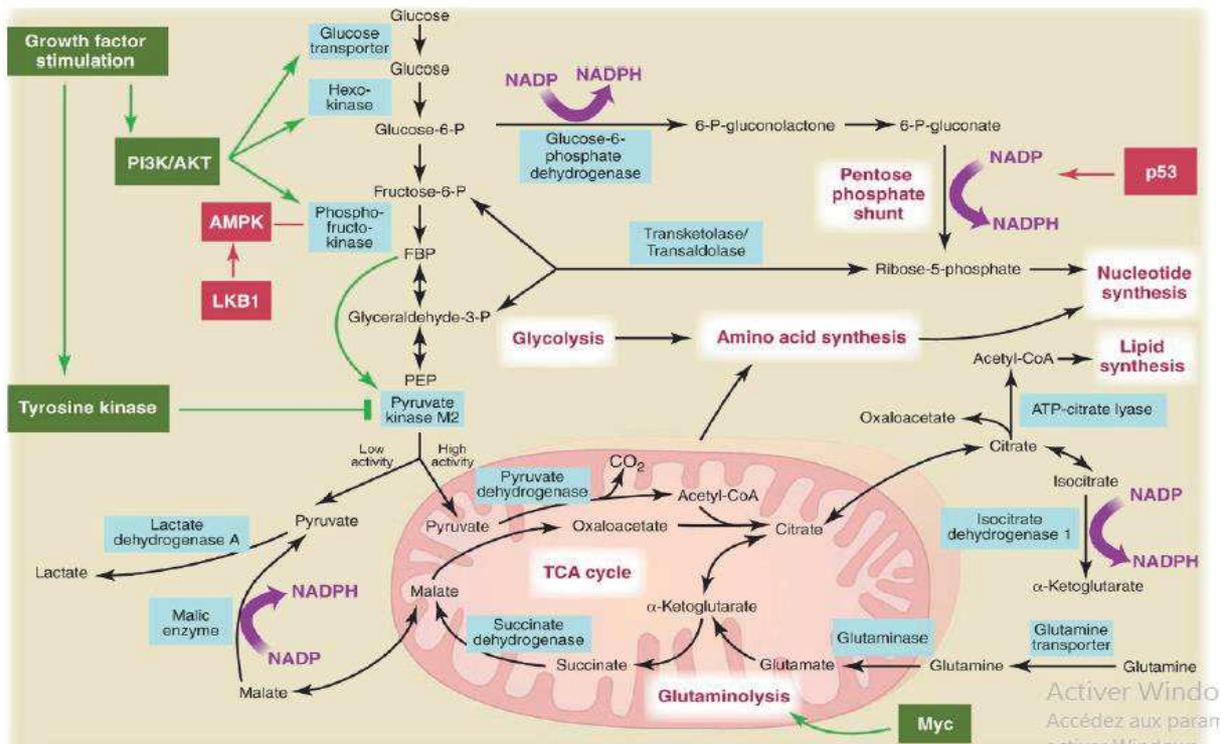


**Fig. 8 :** Régulation cellulaire des signaux de stress médié par p53.

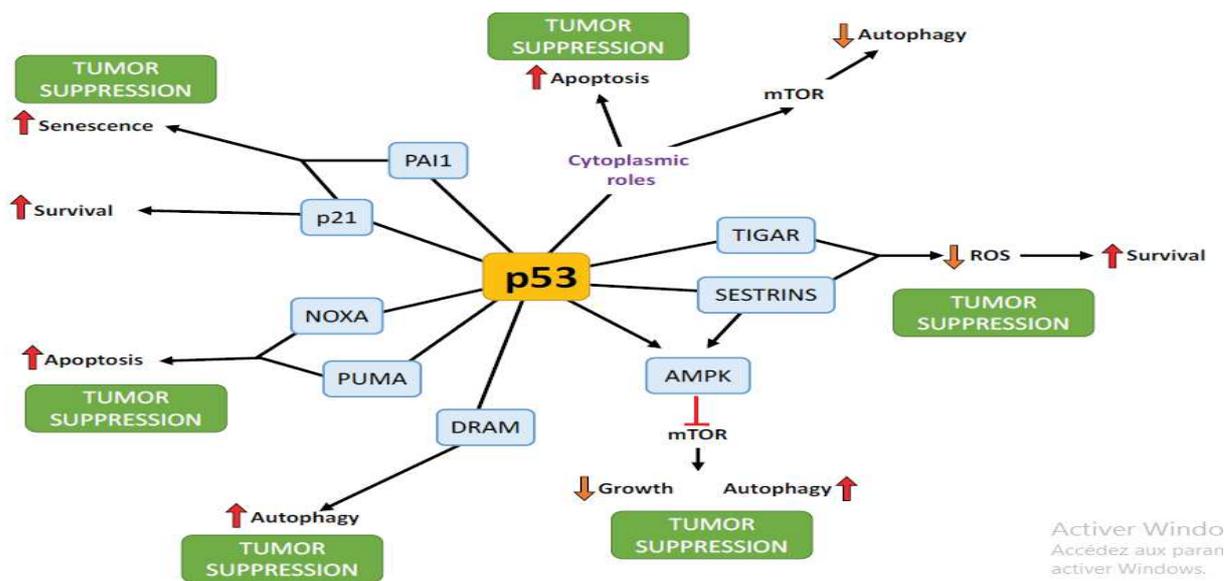
### 3 -P53 et Métabolisme:

La protéine p53 est capable d'activer, mais également de réprimer, la transcription de nombreux gènes clés du métabolisme (Vousden et Prives, 2009). Elle est donc impliquée dans le contrôle de la la voie des pentoses phosphates, la phosphorylation oxydative, le métabolisme des lipides ou celui de certains acides aminés non essentiels, tels que la glutamine ou la sérine (figure 9), elle permet l'inhibition de la glycolyse via différents mécanismes impliquant principalement la répression transcriptionnelle des transporteurs du glucose Glut1, Glut3 et Glut4 (Schwartzenberg-Bar-Yoseph et al., 2004; Kawachi k et al., 2008) et l'activation transcriptionnelle de TIGAR (tumor protein 53-induced glycolysis andapoptosis regulator) (figure 10), qui favorise le flux d'intermédiaires de la glycolyse vers la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates (Bensaad et al., 2006). En effet il a été démontré que p53 favorise la respiration mitochondriale à travers l'activation de SCO2 (synthesis of cytochrome c oxydase) (Matoba et al., 2006, Hu et al., 2010; Suzuki et al., 2010), ainsi que la biosynthèse et le bon fonctionnement des mitochondries en régulant directement TFAM (transcription factor A mitochondrial) (Yoshida Y et al., 2003) et la polymérase gamma (Achanta et al., 2005). À ce titre, certains chercheurs ont suggéré que l'inactivation fonctionnelle de p53 au cours de la transformation cellulaire pourrait intervenir dans le changement métabolique décrit sous le nom de l'effet Warburg (Hu et al., 2010 ; Suzuki et al., 2010), qui favorise la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative mitochondriale (Mathupala et al., 2005; Ide et al., 2009).

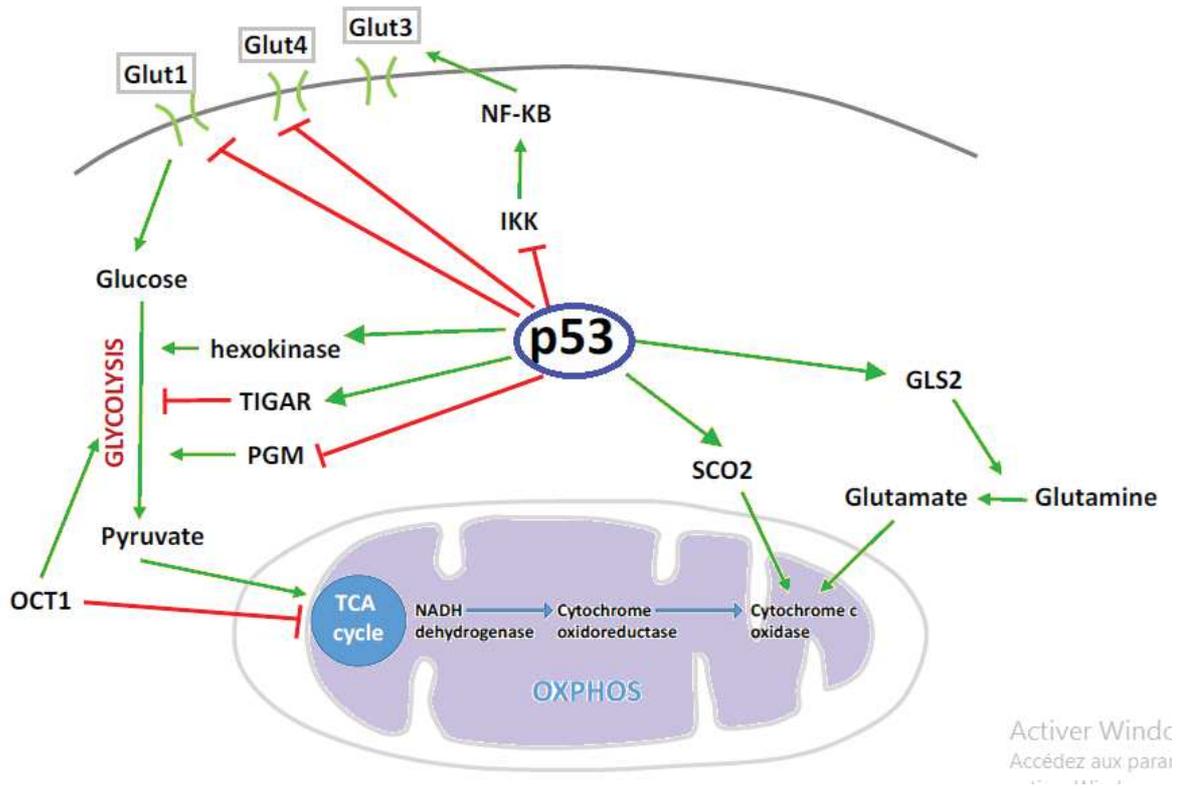
P53 intervient également dans certaines cascades de signalisation qui jouent de multiples rôles dans le métabolisme, comme la voie IGF (insulin-like growth factor)-PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-mTOR mammalian target of rapamycin) (Vousden et Prives, 2009) (figure 11).



**Fig. 9:** Métabolisme des cellules prolifératives (Vander et al., 2009).



**Fig. 10:** Réponses de p53 durant la suppression de tumeur (Vousden et Prives, 2009).



**Fig. 11:** Représentation schématique des différents effets métaboliques régulés par p53.

---

#### IV- Cancer et traitements:

Le cancer est un problème majeur de santé publique puisque malgré la mortalité soit en baisse depuis ces vingt dernières années, en 2012 cette maladie était responsable de 148 000 décès en France. Il existe divers formes de cancer ce qui fait appel à divers types de traitements dont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, les traitements ciblés, l'hormonothérapie et l'immunothérapie, seules ou associés entre eux, constituent les principaux traitements.

\* **La chirurgie** : constitue le plus souvent la première étape du traitement et peut-être suivie de chimiothérapie et/ou de radiothérapie.

Elle est utilisée dans 80% des cas et est, en générale, préconisée dans le cas de tumeurs solides, non métastatiques. En effet, dans ce cas le tissu tumoral est retiré, dans l'idéal en totalité, afin d'être éliminé (**INCa 2014**).

\* **La radiothérapie**: consiste à l'utilisation de rayonnements (rayons ou radiations) de manière très localisée afin de préserver au maximum les tissus sains avoisinants (**INCa 2009**). Cette thérapie peut également être prescrite afin de se débarrasser des cellules cancéreuses qui auraient échappé au lors d'une chirurgie. La radiothérapie occupe une place importante dans le traitement des cancers du sein, quel que soit le stade d'évolution de la tumeur et quel que soit le protocole thérapeutique, car elle limite le risque de récurrence locale et réduit la mortalité à long terme (**Brioschi et al., 2012**). Quelle que soit l'indication de la radiothérapie, la technique d'irradiation est la même, seuls les volumes cibles traités ainsi que les doses délivrées varient selon les cas (**Morère et al., 2011**).

\* **L'hormonothérapie** : Certains cancers tels que les cancers du sein et de la prostate, sont sensibles aux hormones sexuelles : celles-ci stimulent la croissance des cellules cancéreuses. En allant « bloquer » le récepteur hormonal sur ces cellules cancéreuses, on les empêche de proliférer. L'hormonothérapie est le plus souvent très efficace, notamment dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants (près des trois-quarts des cancers du sein), où elle est souvent prescrite en complément d'une chimiothérapie. Elle a fait diminuer la mortalité liée aux cancers du sein.

\* **La chimiothérapie** : est la méthode la plus utilisée pour traiter les cellules cancéreuses par des produits chimiques cytotoxiques qui vont entraîner soit l'apoptose des cellules tumorales ou le blocage de leur prolifération.

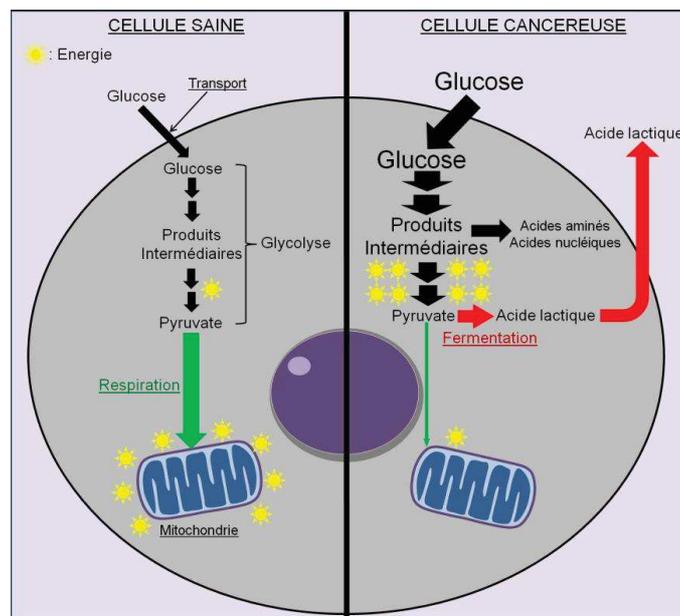
\* **La thérapie ciblée** : Les thérapies ciblées anticancéreuses sont des médicaments qui visent à bloquer la croissance et/ou la propagation des cellules tumorales.

**CHAPITRE II : THERAPIE CIBLÉE: "cibler le métabolisme pour combattre le cancer"****I-Généralités:**

Malgré la découverte de diverses méthodes pour combattre le cancer qui s'intéressent à la multiplication cellulaire (chimiothérapie cytotoxique, radiothérapie,..) malheureusement de sérieux effets secondaires sont observés. C'est pourquoi on voit l'émergence de traitements ciblés (hormonothérapie, immunothérapie, anticorps monoclonaux et certains inhibiteurs de tyrosines kinases...) qui font appel à des produits spécifiques des cellules cancéreuses afin d'en réduire les effets néfastes sur les autres cellules.

La prolifération chronique et incontrôlée des cellules cancéreuses n'est pas le résultat unique d'une dérégulation du contrôle moléculaire de la prolifération cellulaire, mais correspond aussi à une adaptation du métabolisme énergétique à cette nouvelle demande (Villalba et al., 2013).

En présence d'oxygène, la plupart des cellules différenciées utilisent la phosphorylation oxydative pour générer de l'énergie. Les cellules cancéreuses, quant à elles, utilisent la fermentation lactique quelles que soient les conditions d'oxygénation (Figure12) (Villalba et al., 2013). Elles consomment énormément de glucose et produisent beaucoup d'acide lactique car leurs mitochondries sont incapables de métaboliser le pyruvate en ATP (cycle de Krebs) (Stacpoole et al., 2008). Cette adaptation métabolique irréversible des cellules cancéreuses porte le nom d'effet Warburg (Vander et al., 2009).

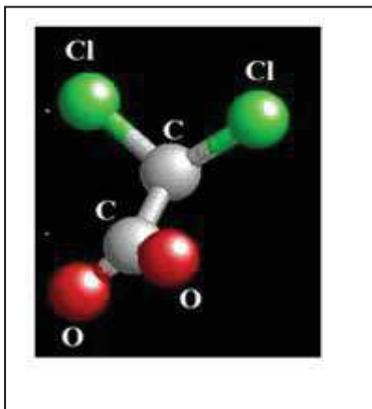


**Fig. 12:** Dérégulation du métabolisme énergétique dans les cellules cancéreuses (Grégory Ségala).

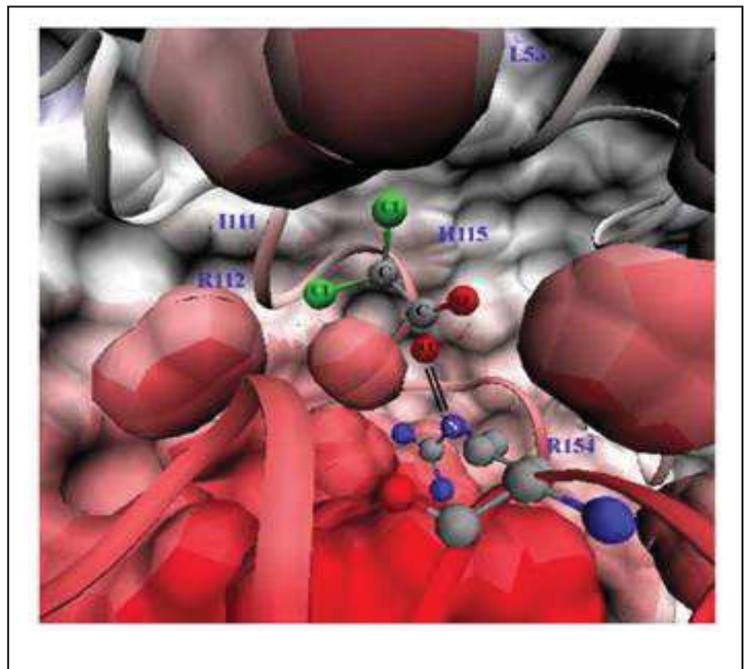
Bien que les travaux d’Otto WARBURG ont été publiés depuis les années 30, cette particularité des cellules cancéreuses n’avait jamais vraiment été explorée en tant que possibilité thérapeutique. Depuis peu de temps, plusieurs équipes commencent à s’intéresser à cette particularité métabolique commune à la plupart des cellules cancéreuses pour développer de nouveaux traitements : le dichloroacétate (DCA) fait partie de cette approche métabolique du traitement des cancers.

## II-DCA et cancer:

Le dichloroacétate (DCA) est une petite molécule chimique (150 Da) relativement non-toxique que l'on ne retrouve pas à l'état naturel dans l'organisme ou dans la nature (**figure 13**). Le DCA est un activateur de la pyruvate déshydrogénase (PDH) (**Bartrons et Caro, 2007**), complexe enzymatique qui permet le métabolisme du pyruvate en acétyl-CoA et permet donc au pyruvate d'être consommé dans le cycle de Krebs durant la respiration mitochondriale (**Villalba et al., 2013**) (**figure 14**). Ce qui peut conduire à une augmentation du débit d'oxygène dans la chaîne respiratoire, associée à une génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS), le changement de l'équilibre redox (NADH/NAD ratio), le potentiel de la membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi$ ) et le gradient de pH. Tous ces paramètres sont capables de provoquer l'apoptose tumorales (**Charni et al., 2009**).

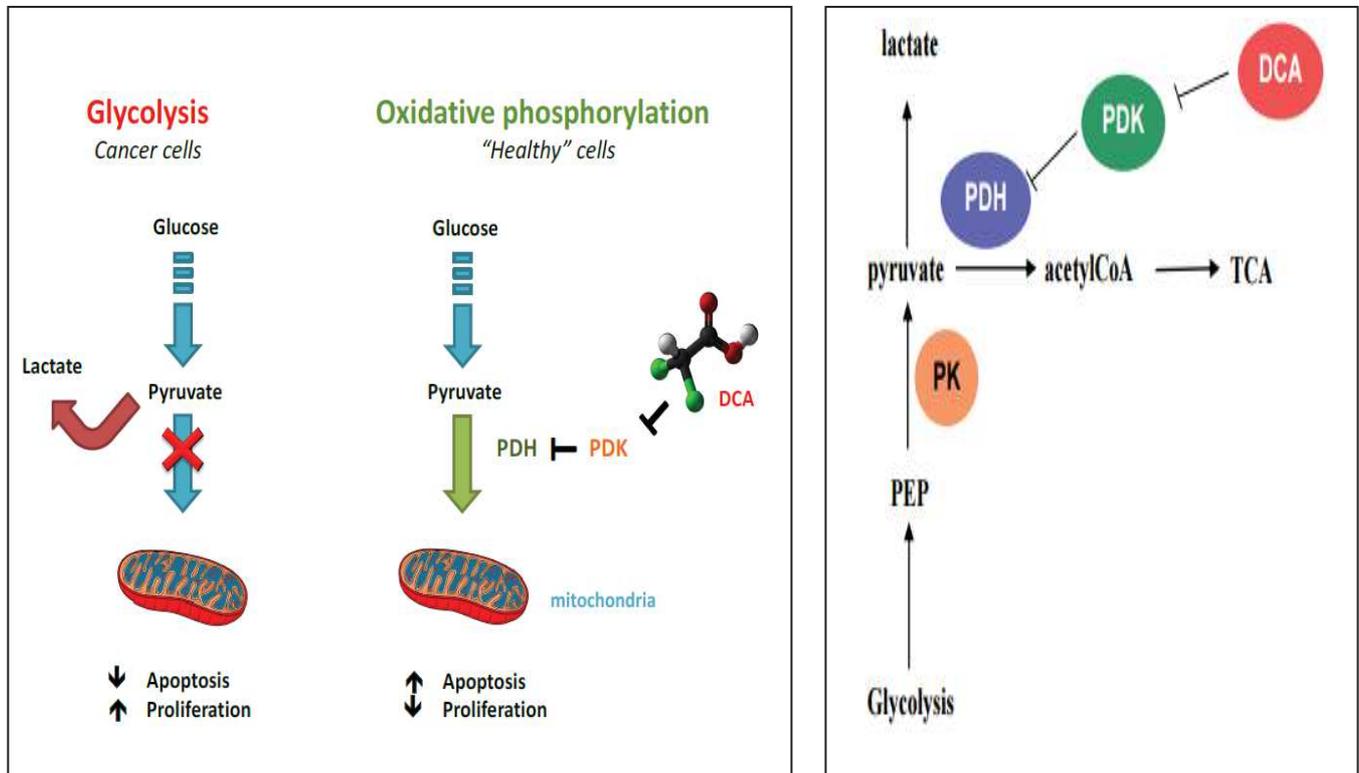


**Fig. 13:** Structure de DCA.



**Fig. 14:** Structure de pyruvate déshydrogénase kinase 2 (PDK2) liée au dichloroacétate (DCA) (**Sutendra and Michelakis, 2013**).

Les effets anti-cancer du DCA (**Bonnet et al., 2007**) résultent de sa capacité à corriger le métabolisme respiratoire tumorale de la fermentation lactique vers la phosphorylation oxydative d'où l'augmentation de la concentration des radicaux libres qui induit l'activation des voies de signalisations responsables de la mort des cellules tumorales sans aucun effets sur les cellules saines (**Flavin, 2010; Michelakis et al., 2010**) (**figure 15**).



**Fig. 15: Mode d'action du DCA (Sutendra and Evangelos., 2013).**

Le DCA, utilisé depuis longtemps dans le traitement des maladies métaboliques (**Stacpoole et al., 2008**), a commencé d'être utilisé dans les traitements de cancer suite aux résultats publiés par l'équipe de Dr Michelakis qui a confirmé que le DCA utilisé *in vitro* permet l'élimination des cellules tumorales (**Michelakis et al., 2008**). Ainsi Sutendra et ses collaborateurs ont montré que le DCA, *in vivo*, administré dans l'eau, a pu augmenter très nettement la survie de souris auxquelles des cellules de tumeurs pulmonaires (SCLC ou Small Cell Lung Cancer) avaient été greffées (**Sutendra et al., 2012**). De même, des souris atteints de cancer du sein ont eu moins de métastases lorsqu'elles recevaient du DCA (**Sun et al., 2010**).

Ensuite Michelakis a encore confirmé que le DCA fonctionne chez des patients de la même façon que sur des modèles animaux (**Michelakis et al., 2010**). Ils ont évalué l'intérêt du DCA chez des patients atteints de glioblastomes multiformes, une tumeur cérébrale de très mauvais pronostic : environ 7 mois de survie médiane après radiothérapie et chimiothérapie.

Après 15 mois de traitement avec le DCA 4 sur les 5 patients traités étaient encore en vie avec une tumeur stabilisée!(**Michelakis et al., 2010**).

Depuis lors, plusieurs groupes indépendants à travers le monde ont commencé à évaluer l'effet de DCA sur plusieurs types tumoraux (Ectodermale, Mesodermale, Endodermale) (**Kankotia et Stacpoole, 2014**) (**Tableaux 3-5**). D'après les statistiques récentes (juin 2014) il y'a peu près 74 études *in vitro* et 25 *in vivo* et 47 études des co-traitement (**Kankotia et Stacpoole, 2014**).

**Tableau 1: Thérapies des cancers d'origine ectodermale (Kankotia et Stacpoole, 2014).**

Type cellulaire	In vitro DCA dosage (mM)	In vivo DCA dosage (mg/kg)	Co-traitement ou analogue	Réf #
<b>Ectodermale</b>				
<b>Rat Brest</b>	1-5	23-200		(Sun et al., 2010)
<b>human glioblastoma</b>	10	50	Bevacizumab	(Kumar et al., 2013b)
	0.5			(Bonnet et al., 2007)
	0.1-1		Radiation	(Velpula et al., 2013)
	1	100	Fl-EGFR	(Duan et al., 2013)
<b>Rat gliome</b>	1-128	25-125		(Park et al., 2013)
		200		(Park et al., 2013)
	0.25-1		Radiation, etoposide	(Morfouace et al., 2012)
<b>Human médulloblastome</b>	0.1-10		Cisplatin	(Heshe et al., 2011)
<b>Human mélanome</b>	0.05-20	Varied (75mg/L of H2O)	Elesclomol	(Kluza et al., 2012)
<b>Mouse melanoma</b>	2-10	25-100	Poly(IC) immunotherapy	(Ohashi et al., 2013)
		100	Capecitabine	(Vella et al., 2012)
<b>Human neuroblastoma</b>	0,1-10		Cisplatin	(Heshe et al., 2011)
	0,25-2			(Niewisch et al., 2012)
	5-50	2,5-25		(Vella et al., 2012)
	1-30			(Feuerecker et al., 2012)
	25			(Hanberry et al., 2014)
<b>Human squamous</b>	1-40		Sulindac	(Ayyanathan et al., 2012)
	2-8		N-phe. Dichlo. (in vitro)	(Sun et al., 2009)
			5-ALA, PDT	(Li et al., 2012)
	0,001-100		Mitaplatin, cisplatin	(Kwitniewski et al., 2011)
	0,05-0,2			(Xue et al., 2012)
<b>Human Brest</b>	2.5-40		Estradiol derivative	(Stander et al., 2011)
	2.5-80	112	Bicarbonate	(Robey and Martin, 2011)
	5		Arsenic trioxide	(Sun et al., 2011)
	5-30			(Feuerecker et al., 2012)
	0.25-1			(Babu et al., 2011)
	0.001-100		5-ALA, PDT	(Kwitniewski et al., 2011)
	0.5			(Bonnet et al., 2007)
			Mitaplatin* (in vivo)	(Johnstone et al., 2013)
	0.5-5	50		(Sutendra et al., 2013)

**Tableau 2: Thérapies des cancers d'origines endodermales (Kankotia et Stacpoole, 2014).**

Type cellulaire	In vitro DCA dosage (mM)	In vivo DCA dosage (mg/kg)	Co-traitement ou analogue	Réf #
<b>Endodermale</b>				
<b>Human pancreatic</b>		50		(Chen et al., 2009)
	16-25			(Anderson et al., 2009)
	25			(Hanberry et al., 2014)
<b>Mouse carcinoma**</b>	1-10			(Vega-Naredo et al., 2014)
<b>Human colorectal</b>	10-100			(Madhok et al., 2010)
	10	150		(Shahrzad et al., 2010)
	2-20	50	PR-104	(Cairns et al., 2009)
	1-40		Oncolytic AV	(Xiao et al., 2010)
	0,1-1	150	Radiation	(Zwicker et al., 2013)
	1,2-50		3-Methyladenine, Atg7	(Gong et al., 2013)
	75-100	200		(Lin et al., 2014)
<b>Mouse colorectal</b>	1,6-25		DCA-PLA mats*(in vivo)	(Liu et al., 2013)
<b>Human endometrial</b>	1-10			(Wong et al., 2008)
<b>Human Gastric</b>	10-100		5-Fluorouracil	(Hur et al., 2013)
	20		5-Fluorouracil	(Xuan et al., 2014)
<b>Human hepatoma</b>	1-10	100	Sorafenib	
			N-phe. Dichlo.*(in vitro)	(Li et al., 2012)
	1-10		Oncolytic AV	(Xiao et al., 2010)
	0,05-0,2		Mitaplatin*, cisplatin	(Xue et al., 2012)
<b>Human Lung</b>	2,5-40		Sulindac	(Ayyanathan et al., 2012)
			N-phe. Dichlo.*(in vitro)	(Li et al., 2012)
	10		Pt drugs*	(Fiebigler et al., 2011)
			N-phe. Dichlo.*(in vitro)	(Li et al., 2012) (Yang et al., 2010)
	1-40		Oncolytic AV	(Xiao et al., 2010)
	0,02		Mitaplatin*, cisplatin	(Dhar and Lippard, 2009)
	0,5	50-100		(Bonnet et al., 2007)
			Pt drugs* (in vitro)	(Liu et al., 2013)
	50		(Sutendra et al., 2013)	
<b>Human prostate</b>		100	Capecitabine	(Zheng et al., 2013)
	0,01-100		Radiation	(Cao et al., 2008)
			Honokiol DCA*	(Hahm et al., 2014)
	80			(Lin et al., 2014)

**Tableau 3: Thérapies des cancers d'origine mesodermale (Kankotia et Stacpoole, 2014).**

Type cellulaire	In vitro DCA dosage (mM)	In vivo DCA dosage (mg/kg)	Co-traitement ou analogue	Ref #
<b>Mesodermal</b>				
<b>Human cervical</b>	2-16		Cisplatin	(Xie et al., 2011)
	10			(Wu et al., 2013)
	1-40		Oncolytic AV	(Xiao et al., 2010)
	0,02		Mitaplatin*, cisplatin	(Dhar and Lippard, 2009)
	1,6-25		2-Deoxy-D-glucose	(Anderson et al., 2009)
<b>Mouse cervical</b>	1,6-25	25	DCA-PLA mats* (invivo)	(Liu et al., 2012)
<b>Human Lymphoma</b>	5-40			(Kumar et al., 2012)
<b>Mouse lymphoma</b>	2-10	25-100	Poly(IC) immunotherapy	(Ohashi et al., 2013)
	1	112	Cisplatin	(Kumar et al., 2013a)
<b>Human monocytoma</b>	5		DCA-Hb-Hp*	(Zhang and Palmer, 2011)
<b>Human leukemia</b>	0,1-50		Cisplatin	(Heshe et al., 2011)
	1-30		Nutlin-3	(Agnoleto et al., 2014)
<b>Human myeloma</b>	5-25	200	Bortezomib	(Sanchez et al., 2013)
	10-40		Bortezomib	(Fujiwara et al., 2013)
<b>Human ovarian</b>	0,16-0,62			(Saed et al., 2011)
<b>Human fibrosarcoma</b>	0,45-1,35		Omeprazole, tamoxifen	(Ishiguro et al., 2012)
<b>Human osteosarcoma</b>	0,1-10		Cisplatin	(Heshe et al., 2011)
	0,02		Mitaplatin*, cisplatin	(Dhar and Lippard, 2009)
<b>Human rhabdomyosarcoma</b>	0,1-10		Cisplatin	(Heshe et al., 2011)
		86		(Sorokina et al., 2011)
<b>Human sarcoma</b>	0,1-10		Cisplatin	(Heshe et al., 2011)
<b>Human testicular</b>	0,02		Mitaplatin*, cisplatin	(Dhar and Lippard, 2009)

**CHAPITRE III: LA CHIMIOThERAPIE****I-Introduction:**

La chimiothérapie est un type de traitement contre le cancer qui fait appel à des médicaments qui visent à empêcher les cellules cancéreuses de se multiplier mais qui détruisent aussi les cellules saines de l'organisme ce qui explique la toxicité non spécifique de la chimiothérapie anticancéreuse. Contrairement à la chirurgie ou à la radiothérapie, qui sont des thérapeutiques anticancéreuses à visée locale, la chimiothérapie est susceptible d'agir sur les cellules tumorales disséminées dans tout l'organisme (Leichtnam et al., 2011).

La chimiothérapie a prouvé son efficacité avec la régression de la tumeur qui peut se traduire par une rémission partielle de quelques mois à plusieurs années (HAS, 2013) dans plusieurs types de cancers, comme la maladie de Hodgkin, la leucémie, les lymphomes, le choriocarcinome, les tumeurs testiculaires et certains sarcomes (Lechat, 2006).

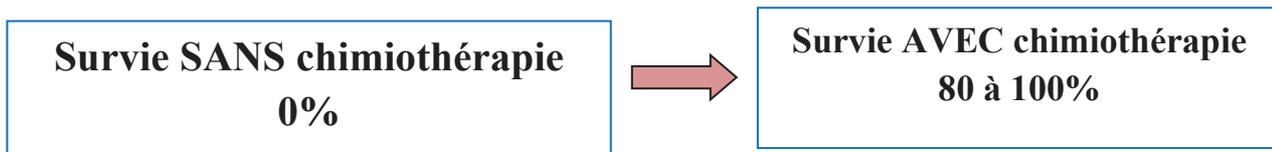
**II- Les différents types de chimiothérapies:**

En fonction de l'objectif de la chimiothérapie on peut distinguer quatre types de chimiothérapie (Société canadienne du cancer, 2015):

- la chimiothérapie à visée curative,
- la chimiothérapie à visée adjuvante,
- la chimiothérapie à visée palliative,
- la chimiothérapie expérimentale.

**1- La chimiothérapie à visée curative :**

Généralement complémentaire à une autre étape, la chimiothérapie à visé curative constitue l'étape majeure qui peut amener la guérison du malade.



Cette méthode est utilisé en cas de divers type de tumeurs tel que les :

- Leucémies,
- Lymphomes,

- Cancers du testicule,
- Chorio-carcinomes placentaires,
- Tumeurs "embryonnaires" de l'enfant,
- Sarcomes osseux,
- Neuroblastomes,
- Cancers de l'ovaire,
- Cancers du poumon à petites cellules,
- Certains cancers inflammatoires du sein.

### 2- Chimiothérapie adjuvante :

On utilise la chimiothérapie adjuvante lorsqu'on sait que, statistiquement, les malades ont plus de chances de survivre avec la chimiothérapie que sans. Mais, cette méthode n'est pas satisfaisante pour tous les malades puisque les complications peuvent venir annihiler l'effet positif attendu de la chimiothérapie.

Ce type de traitements peut être efficace en cas des:

- Cancers du sein,
- Cancers de la vessie,
- Cancers colorectaux.

### 3- La chimiothérapie Palliative:

Elle est indiquée en présence de tumeurs ayant déjà métastasé ou sur des tumeurs multicentrique.

On attend de ces chimiothérapies qu'elles prolongent la vie des patients et qu'elle en améliore la qualité de vie en augmentant la durée de la période sans récurrence ou métastases.

Cette méthode peut être administrée dans certains types de cancer tel que les:

- Leucémie myéloïde chronique,
- Leucémie lymphoïde chronique,
- Myélome,
- Cancers du sein métastatiques,
- Sarcomes des tissus mous,
- Cancers de la thyroïde,
- Mélanomes

Les agents anticancéreux utilisés peuvent être classés soit en fonction de leur mécanisme d'action, soit en fonction de leur famille d'appartenance. Ces classements sont présentés dans le **tableau 4**.

**Tableau 4: Classement des anticancéreux selon leur mode d'action physiologique.**

	Agents cycle-dépendants	Agents phase-dépendants
<b>Principe d'action</b>	Agissent pendant toutes les phases du cycle cellulaire ; Les cellules en G0 ne sont pas atteintes.	Agissent pendant une phase précise du cycle cellulaire.
<b>Famille des anticancéreux</b>	<p><u>Les agents alkylants</u> : créent des ponts intramoléculaires entre les 2 brins d'ADN ;</p> <p><u>Les agents intercalants</u> : s'introduisent dans l'ADN induisant un changement de conformation de ce dernier ;</p> <p><u>Les inhibiteurs des topoisomérases I et II</u> : permettent une coupure définitive de 1 ou des 2 brin(s) d'ADN.</p>	<p><u>Les antimétabolites</u> : agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques pendant la phase S ;</p> <p><u>Les antimitotiques</u> (ou poisons du fuseau) : bloquent le cycle au niveau de la mitose en interagissant avec des protéines intervenant dans la formation du fuseau cellulaire.</p>

Bien que la chimiothérapie a montré son efficacité contre divers types de cancers malheureusement, cette méthode reste limitée puisque, d'une part certains types de cancers sont naturellement résistants à tous les médicaments (exemple : cancers du rein ou de la thyroïde) ,et d'autre part certaines cellules tumorales possèdent ou acquièrent la possibilité de contourner les mécanismes d'actions des médicaments de chimiothérapie conduisant à l'échec du traitement : c'est ce qu'on appelle la chimiorésistance.

### III- La résistance à la chimiothérapie:

Les mécanismes de résistances sont à l'origine de l'échec primaire ou secondaire des chimiothérapies. Parmi les paramètres qui peuvent intervenir dans la chimiorésistance on peut citer (INCA, 2016) (figure16):

#### 1- Mécanismes pharmacocinétiques:

Pour être efficace le médicament doit atteindre la tumeur en quantité suffisante. Cela dépend soit:

- Des propriétés de médicament (de l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination)
- De caractéristiques liées à la tumeur ou à l'organe malade (inaccessibilité de tumeurs peu vascularisées organes sanctuaires : cerveau, gonades).

#### 2- Mécanismes pharmacodynamiques:

Plusieurs mécanismes sont évoqués :

- Diminution de l'entrée:

Certains médicaments ont besoin d'un réseau de transporteur pour pénétrer dans la cellule : la perte d'activité d'un transporteur entraîne une résistance vis à vis de l'activité anti-tumorale.

- Augmentation de la sortie

Plusieurs transporteurs membranaires vont expulser le médicament de la cellule : glycoprotéine P, protéines MRP et LRP.

### 3- Résistance multiples à la chimiothérapie (MDR):

Les cellules présentant un phénotype MDR sont des cellules résistantes à de nombreux agents chimiothérapeutiques, qui n'ont bien souvent aucune similitude chimique et fonctionnelle **(Dmitriev et al., 2011)**.

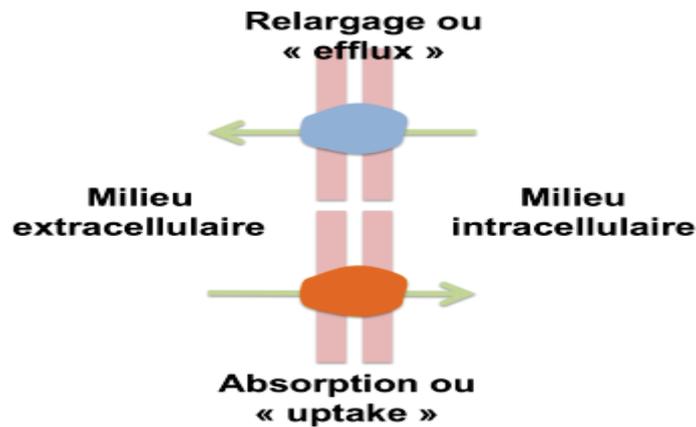
Ce phénotype MDR est le résultat de l'expression ou de la surexpression de glycoprotéines ayant la capacité de transporter activement divers types de substrats chimio thérapeutiques, hors de la cellule contre un gradient de concentration et par conséquent, les cellules tumorales peuvent échapper à l'effet cytotoxique des drogues et devenir résistantes à leur action) (**Yo et Morris, 2007 ; Wink et al., 2012**). Ces glycoprotéines qui effluent les drogues sont principalement des protéines membranaires de la famille des ABC (ATP binding cassette) **(Mo et Zhang, 2012)**.

Ce phénomène de la chimiorésistance est présent dans la plupart des cellules plus particulièrement dans les épithéliums de l'intestin, le foie **(Schinkel et Jonker, 2003 ; Wink et al., 2012)**, les reins et l'endothélium **(Gottesman, 2002; Rudin et al., 2011)**.

## **IV- Les transporteurs ABC:**

### 1- Généralités :

Toutes les cellules et les compartiments subcellulaires sont séparés du milieu extérieur par des membranes lipidiques qui assurent le passage régulé et sélectif des molécules nécessaires à la survie et au fonctionnement cellulaire. Ces transporteurs membranaires jouent un rôle très crucial soit dans l'absorption cellulaire vers le milieu intracellulaire soit dans le relargage (efflux) à l'extérieur de la cellule, de nombreux composés indispensables au métabolisme cellulaire comme les sucres, les acides aminés, les nucléotides et les ions inorganiques **(Higgins C et al., 1992) (figure 16)**.



**Fig. 16:** Schéma représentatif de mécanismes de transports à travers la membrane.

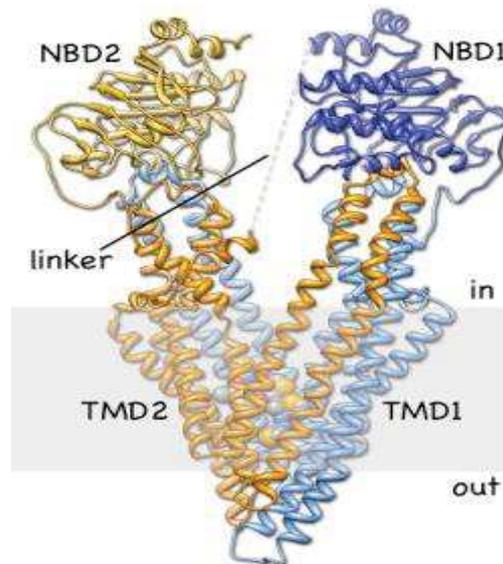
Ces transporteurs ont été découverts et étudiés dans les bactéries dès les années 1950 mais ce n'est qu'en 1990 que leur présence a été établie dans tout le règne vivant des procaryotes au eucaryotes (Higgins et al., 1992). Les eucaryotes ne possèdent que des systèmes d'exports, alors que les procaryotes possèdent à la fois des systèmes d'exports et d'imports (Dean et al., 2001)

Chez l'Homme, ces protéines sont localisées au niveau de la membrane cellulaire permettant le transport unidirectionnel de diverses substances endogènes ou exogènes en utilisant l'énergie procurée par l'hydrolyse de l'ATP dont leur nom "ATP binding Casette".

## 2- Structures:

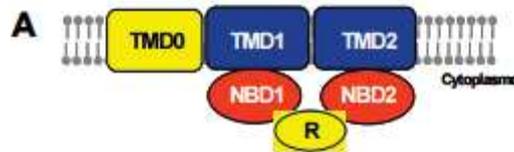
Malgré une grande variété de substrats transportés (ions, stérois, macromolécules...), des localisations tissulaires différentes et la variété des fonctions assurées, les transporteurs ABC possèdent une structure conservée et donc sont organisés en quatre domaines (Stephan, 2015) (figure 17):

- ❖ 2 domaines hydrophobes transmembranaires composés de plusieurs hélices transmembranaires appelé TMD ( Transmembrane Domain).
- ❖ 2 domaines liant et hydrolysant l'ATP : NBD ( Nucleotide Binding Domain) jouant un rôle de transport actif du substrat par hydrolyse de l'ATP (fonction ATPase) ce explique clairement la fonction des motifs NBD.



**Fig. 17:** Structure typique de l'ATP Binding Cassette (Stephan, 2015).

Des domaines optionnels (jaunes) (**figure 18**) existent chez certains transporteurs ABC, tels que les domaines régulateurs (R) ou un domaine transmembranaire supplémentaire (TMD0). Ces domaines sont exprimés en sous-unités indépendantes comme cela est souvent le cas chez les procaryotes, ou en une seule chaîne polypeptidique plus fréquemment rencontrée chez les eucaryotes.



**Fig. 18 :** Organisation schématique des transporteurs ABC.

#### a- Les domaines transmembranaires (TMD) :

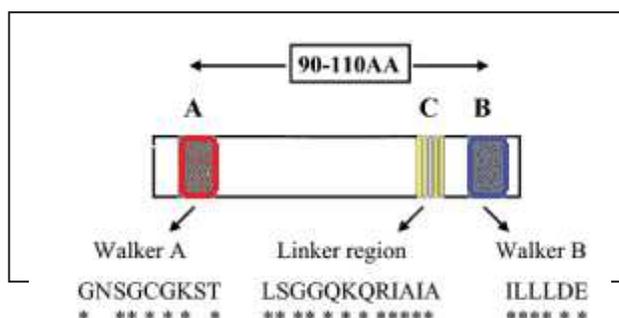
Les deux TMD traversent plusieurs fois la membrane via des hélices  $\alpha$ . Typiquement, il y a six hélices par domaine, soit un total de douze hélices par exportateur. Des variations dans cette formule peuvent refléter des fonctions auxiliaires de ces hélices, telle que l'insertion membranaire ou l'activité importatrice du transporteur (**Chan et al., 2007**).

#### b -Les domaines de liaison des nucléotides (NBD) :

Les NBD sont des domaines hydrophiles qui interagissent avec les boucles intracellulaires des TMD. Ils comprennent les séquences consensus : la signature ABC composé d'une douzaine d'acides aminés, présente uniquement dans les protéines ABC. Cette séquence, appelée communément signature S des protéines ABC, ou motif C (**Gottesman et al., 1995**), commence

généralement par la séquence « LSGG » (**Higgins et al., 1986**) et correspond plus largement à la séquence L-S-G-G-Q-Q/R/K/-Q-R. Le rôle de cette signature n'a pas encore été élucidé complètement, mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans la transduction du signal entre les NBD et les TMD (**Hopfner et al., 2000**).

Le NBD comprennent aussi les motifs A et B de Walker (**Figure 19**). Il est important de noter que la conservation de ces domaines permet de définir et de délimiter la famille. Plusieurs structures cristallines de ces NBD ont été déterminées et présentent toutes un repliement très similaire. Cependant l'interprétation des données cristallographiques diffère significativement quant à l'assemblage oligomérique des NBD.



**Fig. 19:** Schéma illustrant les séquences consensus des domaines de liaison des nucléotides (NBD).

### 3- Classification:

Selon leur structure fonctionnelle, Dean et ses collaborateurs ont pu répartir cette famille en sept sous-familles, allant de la sous-famille A à la sous-famille G (**Dean M et al., 2005; Zhang et al., 2007 ; Mo et Zhang, 2012; Piehler et al., 2012**). Cette nomenclature est en accord avec l'arbre phylogénétique des gènes ABC humains.

#### a- Les sous-familles de transporteurs ABC:

En se basant sur leur conservation de séquences, plus précisément celles de leurs domaines NBD, la distribution et l'orientation de ces domaines entre eux les gènes des ABC ont été répartis en sept sous-familles:

*La sous-famille ABCA:* comprend 12 transporteurs entiers impliqués principalement dans le transport des lipides.

*La sous-famille ABCB:* C'est la seule sous-famille chez les mammifères comportant à la fois des transporteurs entiers et des héli-transporteurs. Actuellement, 11 membres constituent cette sous-famille dont 4 transporteurs entiers (ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11) et 7 héli-transporteurs (ABCB2 et ABCB3, ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9 et ABCB10). Le transporteur ABCB1 est le premier transporteur connue par sa capacité à conférer le phénotype « MultiDrug

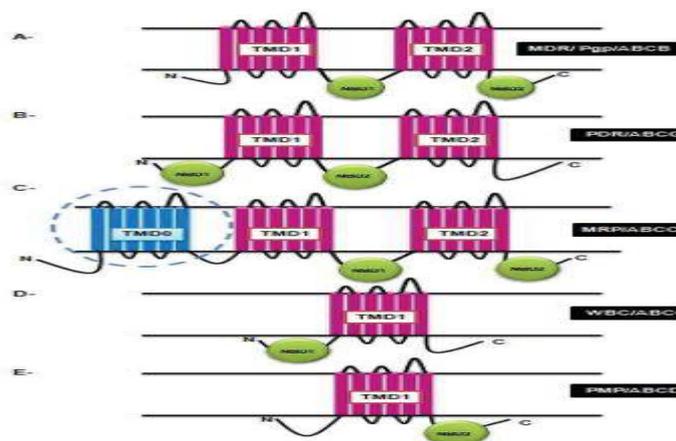
Resistance » aux cellules cancéreuses (**Juliano et al., 1976**). Nous reviendrons plus en détails dans cette introduction sur les propriétés de ce transporteur, sur lequel porte l'essentiel de mon travail de thèse.

La sous-famille ABCC: La sous-famille ABCC contient 12 transporteurs entiers avec des fonctions multiples. Les transporteurs ABCC1 et ABCC5 (**Ritter et al., 2005**) sont les principaux transporteurs responsables d'efflux de médicaments cytotoxiques. ABCC2 transporte les anions organiques du foie vers la bile.

La sous-famille ABCD: Cette sous-famille contient 4 héli-transporteurs (**Shani et al., 1998**) qui fonctionnent en homo et/ou hétérodimères pour assurer le transport des acides gras.

La sous-famille ABCE et ABCF: Les transporteurs appartenant à ces deux sous familles sont des protéines dépourvues de domaines transmembranaires et n'ayant aucune fonction de transport membranaire. La sous-famille ABCE comporte un seul membre qui est l'ABCE1 connu par son rôle primordial dans l'assemblage de la capsid du virus VIH (**Zimmerman et al., 2002**) et agit comme un inhibiteur de la ribonucléase (**Chen et al., 2006**). La sous-famille ABCF comporte quant à elle, trois membres, pour lesquels aucune fonction n'est connue à ce jour. Cependant, une surexpression d'ABCF2 suite à un traitement par chimiothérapie a été observée chez certains patients (**Tsuda et al., 2005**).

La sous-famille ABCG : La sous-famille ABCG est composée de 5 héli-transporteurs « inversés », c'est à dire ayant le NBD du côté N-terminal et le TMD du côté C-terminal (**Figure 20**). Le transporteur ABCG2 est le membre le plus important de cette famille responsable de la résistance multiple aux médicaments au-delà de son rôle initialement attribué : BCRP pour « Breast Cancer Resistance Protein ». La BCRP est une petite protéine membranaire glycosylée de 655 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 72 kDa (**Dean et al., 2001**). L'expression de la BCRP n'est pas limitée à certaines cellules cancéreuses mais est également retrouvée dans différents organes et tissus sains.



**Fig. 20:** Arrangement des domaines structuraux caractéristiques des transporteurs ABC des principales sous-familles (Sanchez-Fernandez et al., 2001).

4- Substrats et modulateurs des transporteurs ABC:

Les transporteurs ABC constituent une famille de protéines impliquées dans le transport de différents composés endogènes ou de xénobiotiques (**Tableau 5**). Seules les membres des familles B, C et G sont capables de transporter des médicaments anticancéreux.

Plusieurs recherches ont pu identifier de nombreuses molécules ayant la capacité d'inhiber ou moduler l'activité des transporteurs ABC.

Des modulateurs des transporteurs ABC ont été développés par l'industrie pharmaceutique dans le but de réverser le phénotype MDR des cellules cancéreuses qui exprime fortement ces transporteurs (**Abele et Tampe, 2004**). Les inhibiteurs de deuxième (valsopodar, biricodar) puis de troisième génération (elacridar, tariquidar, zosuquidar) sont devenus de plus en plus puissants et de plus en plus sélectifs vis-à-vis des transporteurs ABC (**Tableau 6**).

**Tableau 5:** Substrats des principaux transporteurs ABC.

Transporteur	Substrats	
	Classe thérapeutique	Exemples
P-gp (MDR1/ABCB1)	Anticancéreux	Doxorubicine, daunorubicine, vinblastine, vincristine, étoposide, paclitaxel, taxol, docétaxel, méthotrexate, mitoxantrone
	Opioides	Méthadone, lopéramide, Fentanyl
	Psychotropes	Amitriptiline, Midazolam, rispéridone, citalopram
	Anti-épileptiques	Phénytoïne, Carbamazépine, lamotrigine, phénobarbital, felbamate
MRP1 (ABCC1)	Inhibiteurs de protéase du VIH	Amprenavir, indinavir, saquinavir, nelfinavir, ritonavir
	Antibiotiques	Érythromycine, valinomycine, tétracyclines, fluoroquinolones
MRP4 (ABCC4)	Anticancéreux	Étoposides, vincristine, Doxorubicine, daunorubicine, méthotrexate
	Inhibiteurs de protéase du VIH	ritonavir, saquinavir
MRP5 (ABCC5)	Anticancéreux	Méthotrexate, 6-mercaptopurine, thioguanine, topotécan
	Analogues nucléosidiques	zidovudine, PMEA
BCRP (ABCG2)	Anticancéreux	Méthotrexate, 6-mercaptopurine, thioguanine
	Analogues nucléosidiques	PMEA
BCRP (ABCG2)	Anticancéreux	Doxorubicine, daunorubicine, étoposide, mitoxantrone, méthotrexate, prazosine, topotécan
	Analogues nucléosidiques	Zidovudine, lamivudine

**Tableau 6: modulateurs des principaux transporteurs ABC.**

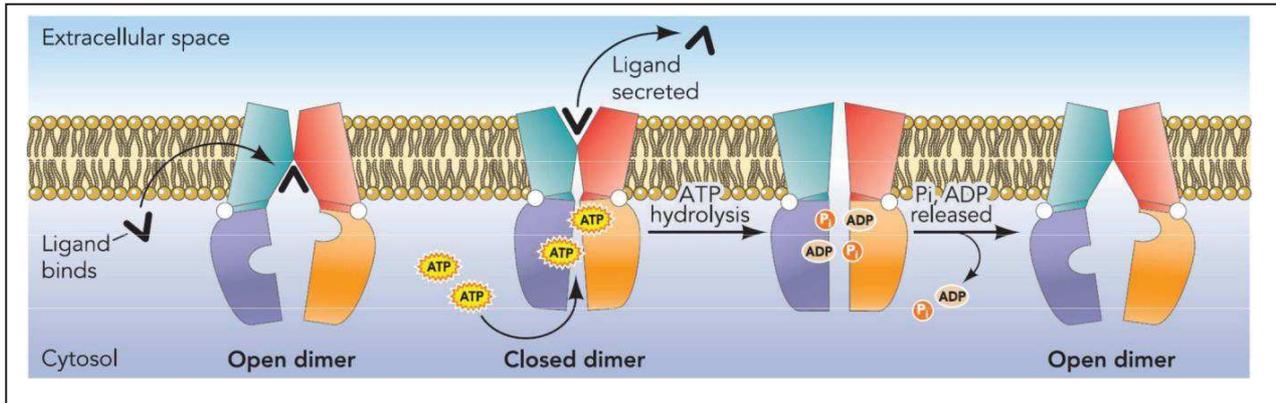
Transporteur ABC	Substrats anticancéreux	Modulateurs
ABCB1	Épipodophyllotoxines, mitoxantrone, taxanes, vinca-alcaloïdes, anthracyclines, imatinib, etc.	Vérapamil, ciclosporine A, valsopodar, biricodar, élacridar, zosuquidar, tariquidar
ABCC1	Étoposide, méthotrexate, vincristine, paclitaxel, SN-38-glucuronide	Probénécide, ciclosporine A, vérapamil, MK571
ABCC2	Méthotrexate, vinblastine, cisplatine, irinotécan	Ciclosporine A, valsopodar, MK571
ABCC3	Étoposide, vinca-alcaloïdes	MK571
ABCC4	Thioguanine, 6-mercaptopurine, méthotrexate	MK571
ABCC5	Thioguanine, 6-mercaptopurine	MK571
ABCG2	Épirubicine, étoposide, mitoxantrone, SN-38, topotécan, imatinib, etc.	Élacridar, fumitremorgie C, KO143

#### 5- Mécanisme du transport :

Pour comprendre les mécanismes du transport des ABC plusieurs modèles ont été proposés (**Bolhuis et al., 1997; Locher et al., 2004**). Récemment et grâce aux progrès de l'analyse structurale, un mécanisme général pour les transporteurs exportateurs a été proposé par Linton et Higgins (2007) et correspond au modèle «ATP-Switch model » qui implique des modifications conformationnelles et des corrélations dans les deux directions entre les domaines nucléotidiques et les domaines transmembranaires (**Linton et Higgins, 2007**).

Le cycle du transport selon le mécanisme ATP-switch comprend 4 étapes majeures (**figure 21**) :

- ❖ Au repos, le transporteur est dépourvu d'ATP et possède une forte affinité pour le ligand, ce dernier arrive par la bicouche phospholipidique (hydrophobe) et se lie au niveau des TMD. Cette interaction induit un changement de conformation des NBDs et par conséquent une augmentation de l'affinité des NBDs pour l'ATP.
- ❖ La deuxième étape est marquée par la fixation d'ATP au niveau des NBD induisant des changements de conformation dans les domaines transmembranaires permettant la libération des ligands.
- ❖ La troisième étape est marquée par l'hydrolyse de l'ATP qui initie la dissociation du dimère de NBDs, par déstabilisation de la conformation fermée du dimère.
- ❖ La dernière étape est caractérisée par le retour de l'ABC à sa conformation initial suite à la libération de l'ADP et du phosphate inorganique (Pi), responsable de la restauration de l'état de haute affinité du transporteur pour le substrat afin d'initier un nouveau cycle (**Sauna et Ambudkar et al., 2000**).



**Fig. 21.** Modèle du cycle de transport des transporteurs ABC (Linton 2007).

Le modèle décrit ci-dessus pourrait correspondre à un exportateur comme ABCB1, (Linton et Higgins, 2007), ABCC1, ABCC5 (Manciu et al., 2003) et HisP (transporteur d'histidine bactérienne) (Kreimer et al. 2000). La façon dont le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP sont choisis, est encore inconnue (Lewis et al., 2004 ; Dawson et al., 2013). Il est probable qu'un mécanisme unique ne puisse pas décrire le cycle catalytique de tous les transporteurs ABC.

#### 6- Implication des transporteurs ABC dans des pathologies humaines :

La famille des transporteurs à ATP binding cassette (ABC) est l'une des familles de protéines les plus importantes, tant par leur nombre important que par leur distribution tissulaire. Leurs distributions tissulaires soit au niveau des organes impliqués dans les phases d'absorption (intestin), de distribution (endothélium vasculaire) et d'élimination (foie et rein) des médicaments leur confèrent un rôle clé dans la détoxification de l'organisme et dans la pharmacocinétique des médicaments anticancéreux. (tableau 7).

Aujourd'hui, avec l'apport massif de données fournies par le séquençage de génome entier, il a été démontré que ces transporteurs sont impliqués dans divers pathologies humaines (Tableau 8) puisque sur les 48 transporteurs ABC connus (Mo et Zhang, 2012), 22 ont été liés à des pathologies chez l'Homme.

**Tableau7:Rôle pharmacologique des transporteurs ABC(Szakacs et al., 2006).**

<i>Transporteurs dont la surexpression provoque résistance ou virulence</i>		
Transporteurs ABC	Gènes	Maladie associée
<i>Transporteurs dont l'inactivation cause une maladie génétique</i>		
MRP1 (Multidrug Resistance Protein2)	ABCC1	Résistance multiple aux agents anti-cancéreux
MDR1 (P-gP) (Multidrug Resistance 3)	ABCB1	Résistance multiple aux agents anti-cancéreux
BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)	ABCG2	Résistance multiple aux agents anti-cancéreux
Pfmdr (Plasmodium Falsiparum Multidrug Resistance)	pfmdr 1	Résistance multiple des parasites aux agents antiparasitaires
CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator)	ABCC7	Mucoviscidose
SUR1 SUR2 (Sulfonyl Urea Receptor 1 et 2)	ABCC8 ABCC9	Hyperinsulinisme familial
MRP2 (Multidrug Resistance Protein2)	ABCC2	Syndrome de Dubin-Johnson
ALDP (AdrénoLeucoDystrophie Protein)	ABCD1	
ABCR (ABC retina)	ABCA4	Maladie de Stargardt/ Dégénérescence maculaire liée à l'âge
ABC1	ABCA1	Maladie de Tangier
PMP70 (Peroxisomal Membrane Protein 70)	PMP70	Syndrome de Zellweger
TAP1 et TAP2 (Transporter associated with Antigen Presentation 1 et 2)	ABCB2 et ABCB3	Immunodéficience
ABC7	ABC7	Anémie sidéroblastique et ataxie
MDR3 (Multidrug Resistance 3)	mdr3	Syndrome de cholestase intrahépatique de type 3
SPGP (Sister P-GlycoProtein)	ABCB11	Syndrome de cholestase intrahépatique de type 2

**Tableau 8: Les transporteurs ABC humains et leurs maladies associées (Schmitz et al., 2006).**

Gene	Synonyms	OMIM	Disorder or phenotype
ABCA1	ABC1	600046	Familial HDL deficiency Tangier disease
ABCA2	ABC2	600047	Alzheimer's disease
ABCA3	ABC3	601615	Neonatal surfactant deficiency
ABCA4	ABCR	601691	Retinopathies Macula degeneration Cone-rod dystrophy
ABCA7	ABC7	605414	Sjögren syndrome
ABCA12	ABC12	607800	Lamellar ichthyosis type II Harlequin ichthyosis
ABCB1	MDR1	171050	Ulcerative colitis
ABCB2	TAP1	170260	Immune deficiency
ABCB3	TAP2	170261	Wegener-like granulomatosis
ABCB4	MDR3	171060	Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC-3) Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP)
ABCB7	ABC7	300135	X-linked sideroblastosis and anemia (XLSA/A)
ABCB11	BSEP	603201	Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC-2)
ABCC2	MRP2	601107	Dubin-Johnson syndrome (DJS)
ABCC6	MRP6	603234	Pseudoxanthoma elasticum (PXE)
ABCC7	CFTR	602421	Cystic fibrosis (CF)
ABCC8	SUR1	600509	Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (PHHI)
ABCC9	SUR2	601439	Dilated cardiomyopathy with ventricular tachycardia
ABCD1	ALD	300371	Adrenoleukodystrophy (ALD)
ABCD3	PXMP1	170995	Zellweger syndrome 2 (ZWS2)
ABCG2	MXR, BCRP	603756	Protoporphyrin IX
ABCG5	White3	605459	$\beta$ -Sitosterolemia
ABCG8	White 4	605460	$\beta$ -Sitosterolemia

**a- Hyperinsulinisme familial (ABCC8):**

L'hypoglycémie hyperinsulinique persistante infantile (1 enfant sur 40 000 en France) est due à des mutations touchant deux gènes situés en 11p15.1, l'ABCC8 et le KCNJ11 codant pour les sous-unités du canal potassique ATP dépendant contrôlant le gradient transmembranaire responsable de la sécrétion endocrine d'insuline. La libération permanente de l'insuline conduisant à une hypoglycémie profonde qui entraîne des convulsions, coma, et en l'absence de traitement, la mort ou des séquelles neurologiques graves (**Benjamin et al., 2005**).

**b- Syndrome de Dubin-Johnson (ABCC2)**

Le syndrome de Dubin-Johnson est une maladie hépatique héréditaire bénigne qui a été décrit pour la première fois en 1954 (**Dubin et al., 1954**). Elle est caractérisée cliniquement par une hyperbilirubinémie et, histologiquement, par un dépôt de pigment brun noir dans les cellules parenchymateuses hépatiques associées. L'hyperbilirubinémie est due à des mutations au niveau du gène ABCC2 localisé dans la membrane canaliculaire des hépatocytes (**Zimniak et al., 1993**), codant pour un transporteur membranaire apical ATP-dépendant qui permet aux hépatocytes de sécréter et d'éliminer les anions toxiques de l'hépatocyte vers la bile (**van Kuijck et al., 1997** ; **Sang Ho Ra et al., 2012**).

**c- Adrénoleucodystrophie (ABCD1):**

L'adrénoleucodystrophie est une maladie génétique neurodégénérative sévère liée au chromosome X. Elle est caractérisée par une démyélinisation progressive du système nerveux central et périphérique, une insuffisance surrénale (maladie d'Addison) et une accumulation d'acides gras à très longue chaîne (AGTLC) dans le plasma, les fibroblastes et les tissus. Le gène impliqué dans cette maladie code pour un demi transporteur ABC appelé ABCD1 (**Mosser et al., 1993 ; Lerner 2009; Kallabi et al., 2016**).

**d- Syndrome de Tangier (ABCA1)**

Cette maladie autosomique récessive a été observée pour la première fois chez les habitants de l'île de Tangier. Elle se manifeste par une coloration orange des amygdales, un foie et une rate hypertrophiés et un taux de cholestérol-HDL plasmatique extrêmement haut. Des travaux récents montrent que la maladie est causée par des mutations du gène ABCA1 (9q31) (**Ceccanti et al., 2016**) responsable de la régulation de l'efflux de cholestérol par l'orientation du cholestérol intracellulaire vers la surface.

**e- Anémie sidéroblastique (ABCC7)**

C'est une maladie génétique très rare survenant uniquement chez les hommes. Elle est associée à une accumulation excessive de fer dans les mitochondries des érythroblastes. Très récemment, il a été montré que le gène responsable de cette maladie est le gène ABCC7, qui code pour une protéine mitochondriale impliquée dans l'homéostasie du fer (**Cabrol et al., 2003**).

**f- Cholestases intra-hépatiques progressives familiales (ABCB4)**

Les cholestases intra-hépatiques familiales sont des maladies récessives infantiles qui se caractérisent par des jaunisses intermittentes, une cholestase sévère et une cirrhose dont l'issue est fatale au cours des dix premières années de vie. Elles se caractérisent par une accumulation de bile (cholestase) dans le foie. En raison d'un défaut de transport de la bile des hépatocytes vers les canaux biliaires due à des mutations au niveau de gène ABCB4 (**Erlinger, 2001**)

**g- Syndrome de Scott (ABCB1)**

Le syndrome de Scott est une maladie hémorragique extrêmement rare, de transmission autosomique récessive. L'anomalie se traduit en effet par l'absence de migration transmembranaire de la phosphatidylsérine (lipide procoagulant) qui pourrait être causé par une mutation de gène contrôlant l'expression des protéines ABCB (**Kerbiriou-Nabias et Geldwerth-Feniger, 2007**).

**h-Tumeurs cérébrales (ABCB1)**

Le rôle des protéines de la famille des ABC a été étudié dans le cas des tumeurs cérébrales par utilisation de souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp (ABCB1) et présentant un mélanome intracérébral. Chez ces souris, la pénétration cérébrale du paclitaxel, un agent anticancéreux substrat de l'ABCB1 a augmenté de manière significative par rapport aux souris sauvages ( **Vautier et al., 2006**). De la même façon une étude réalisée chez des souris ayant subi une implantation intracérébrale d'un glioblastome humain montre une augmentation de la concentration cérébrale de paclitaxel et une diminution de 90 % du volume de la tumeur après un prétraitement par le valspodar, un inhibiteur puissant et spécifique de la Pgp.

**i-Infection VIH (ABCB1)**

L'infection du SNC par le virus VIH est fréquente et peut provoquer divers symptômes neurologiques tels le syndrome neurodégénératif, mais peut aussi mener à l'établissement d'un réservoir latent du virus dans le cerveau. Cependant, certains inhibiteurs de protéases du virus n'ont qu'un accès limité au SNC, ce qui semble principalement dû à leur efflux hors du cerveau par la P-gp (ABCB1). En effet, les concentrations cérébrales d'indinavir, de nelfinavir et de saquinavir augmentent significativement chez les souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp par rapport aux souris sauvages. Par ailleurs, la co-administration chez les souris de l'élacridar, un inhibiteur de la P-gp, et de l'amprénavir, un inhibiteur de protéase du VIH, provoque une augmentation de la concentration d'amprénavir respectivement d'un facteur 13 et 3,3 dans le cerveau et le liquide céphalorachidien (LCR) (**Marchetti et al., 2007**). Ces données attestent donc que la P-gp limite la capacité de ces molécules à atteindre le cerveau.

**V- Chimiorésistance et cancer:**

La chimiorésistance des cancers représente la cause majeure d'échec des traitements anticancéreux. Elle se développe au début essentiellement contre les médicaments administrés au patient en chimiothérapie anticancéreuse, pour ensuite se diriger contre une multitude d'autres médicaments avec lesquels le patient n'a eu aucun contact, d'où le nom de résistance multiples aux chimiothérapies. La première protéine impliquée dans ce phénomène est connue sous le nom de MDR (Multidrug Resistance) ou P-gp (glycoprotéine-P)(ABCB1), protéine de surface surexprimée dans les lignées cancéreuses résistantes (**Juliano et al., 1976**). En 1992, Cole et ses collaborateurs mettent en évidence la surexpression d'un autre transporteur dans certaines lignées cellulaires, ce dernier a été baptisé : MRP1 (Multidrug Resistance protein 1=ABCC1) (**Cole et al., 1992**). Puis

vers la fin des années 90, le phénotype MDR de différents tissus humains ou lignées cancéreuses humaines fût imputé à d'autres transporteurs telques les BCRP (Breast Cancer Resistance Protein=ABCG2) identifiés pour la première fois dans les cellules de cancer du sein (Yang et al., 1995) et le MRP5 (ABCC5) qui est un transporteur spécifique de thiopurine en cas de la leucémie lymphoblastique aiguë (Miyake et al., 1999).

Dans le cadre de ce travail de thèse, on va s'intéresser à l'étude de ces différents transporteurs plus en détails.

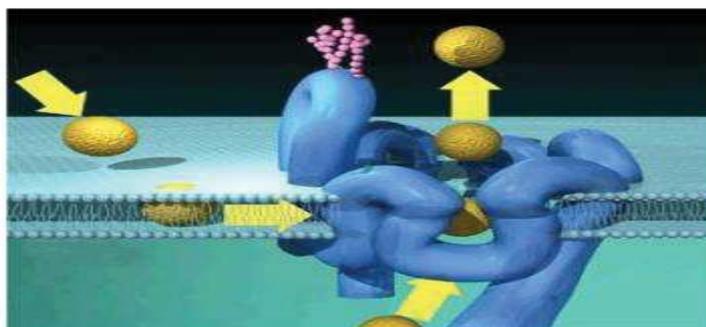
## 1- ABCB1/MDR1/P-gp1 :

### a- Découverte de la Glycoprotéine-P :

En 1972, Dano a pu constater que le mécanisme de résistance aux drogues dû probablement à un transport actif des agents chimiothérapeutiques à l'extérieur des cellules (Dano, 1973). En 1976 Juliano et Ling ont pu cloner pour la première fois un transporteur de la famille des ABC et depuis plus que 40 ans le transporteur ABCB1 est considéré comme la protéine la plus importante dans le phénomène de la résistance multiple aux chimiothérapies puisque 50% des cas de résistance tumorale chez l'Homme est du à la surexpression de la Glycoprotéine-P (Gottesman et Pastan, 1993).

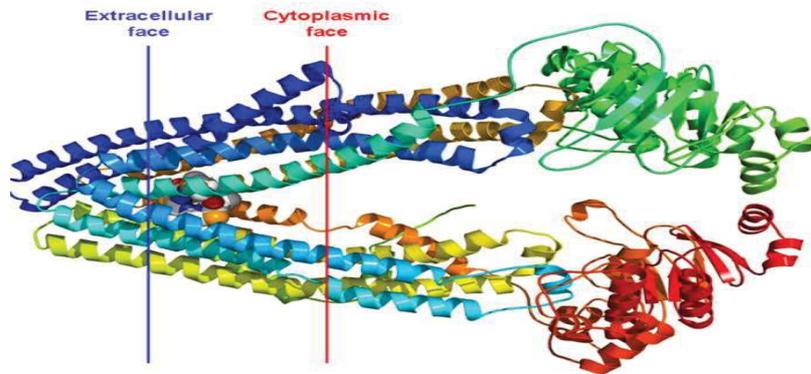
### b- Structure et topologie :

La protéine P-gp est codée par le gène ABCB1 (MDR) situé au niveau de chromosome 7 humain et présente la topologie classique des MDR/ABCB : TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 (Wink et al., 2012) (figure22).



**Fig. 22.** Structure de ABCB1 et son implication dans l'efflux extracellulaire (Aller et al., 2009).

Dans l'objectif d'obtenir une meilleure résolution, une autre structure en 3-D a été obtenue avec une résolution de 20 Å, qui suggère que les TMD sont constitués d'hélices  $\alpha$  (Rosenberg et al., 2003) (figure 23).



**Fig. 23:** Structure 3D de la protéine p-Glycoprotéine murins (Shekfeh , 2011).

#### c- Distribution tissulaire:

La Glycoprotéine-P est exprimée dans divers tissus (Cole, 1992 ; Nies et al., 2004) notamment dans les glandes surrénales, les cellules épithéliales du tractus digestif inférieur (duodénum, jéjunum, iléum et colon) , participant ainsi à la fonction excrétrice et/ou sécrétrice de la muqueuse intestinale (Cordon-Cardo et al., 1990), les tubules proximaux rénaux, dans le foie d'où leur rôle dans l'excrétion de xénobiotiques et d'endobiotiques hors de l'organisme (Ambudkar et al., 1999). La présence de ce transporteur dans la barrière hémato-encéphalique, le placenta et les testicules suggère un rôle de protection de ces tissus vis-à-vis des xénobiotiques (Sugawara et al., 1988; Cordon-Cardo et al., 1989; Thiebaut et al., 1989). La protéine est rencontrée aussi, mais avec une expression plus faible, dans la peau et les muscles squelettiques (Fojo et al., 1987). Ces transporteurs sont présent aussi à la surface des cellules hématopoïétiques (Chaudhary and Roninson, 1991), notamment les macrophages et les lymphocytes T (Klimecki et al., 1994) (Tableau 9).

**Tableau 9:** Localisation et fonctions physiologiques possibles de la p-Glycoprotéine

<b>Localisation</b>	<b>Fonction</b>
Intestin	Efflux dans la lumière
Membrane canaliculaire des hépatocytes	Efflux dans la bile
Pancréas	?
Rein	Sécrétion dans la lumière tubulaire
Barrière hémato-encéphalique	Efflux dans le sang
Barrière hématoméningée	Efflux dans le sang?
Barrière hématoplacentaire	Efflux dans le sang
Barrière hématoréplacentaire (testicules et ovaires)	Efflux dans le sang
Système immunitaire	Modulation de la fonction immunitaire
Glande surrénale	Transport des stéroïdes?
Barrière hématorétinienne	Efflux dans le sang
Cellules endothéliales capillaires du cerveau	Protection contre les neurotoxines?

d- Substrats de la Glycoprotéine-P:

Les protéines ABCB1 peuvent transporter une large gamme d'agents chimiothérapeutiques lipophiles tels que les anthracènes, les anthracyclines, les épipodophyllotoxines, les taxanes et les vinca-alcaloïdes qui peuvent pénétrer dans les cellules tumorales par simple diffusion (**Tableau 10**) (**Loo et Clarke, 2005 ; Wink et al., 2012**). Grâce à leurs implications dans divers mécanismes cellulaires, plusieurs équipes ont pu identifier divers agents modulateurs et inhibiteurs de ce transporteur (**Tableau 11**).

**Tableau 10:** Substrats de l'ABCB1.

Anthracyclines	Daunorubicine, doxorubicine, épirubicine, idarubicine
Vinca-alcaloïdes	Vinblastine, vincristine, vindésine, vinorelbine
Anthracènes	Bisantrène, mitoxantrone
Epipodophyllotoxines	Etoposide, téniposide
Inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules	Colchicine, paclitaxel (taxol), docétaxel
Antibiotiques peptidiques	Gramicidine D, actinomycine D
Inhibiteurs de protéases virales	Ritonavir, indinavir, saquinavir
Fluorophores	Fluo-3-AM, Fura-2-AM, Rhodamine 123, Hoechst 33342/33258, Calcéine-AM
Dérivés de la camptothécine	CPT-11, topotécan

**Tableau 11: Substrat , inhibiteurs et modulateurs de l'ABC B1.**

Groupes de médicaments	Substrats	Inhibiteurs	Inducteurs
Cytostatiques	Vinca-alkaloïdes, Anthracyclines, Taxol, Épipodophyllotoxines		Vinblastine, Doxorubicine
Immunosuppresseurs	Ciclosporine, Tacrolimus	Ciclosporine, Valspodar	
Antiarythmiques	Amiodarone, Propafénone, Digoxine	Amiodarone, Quinidine	
Statines	Simvastatine		
Anticalciques	Vérapamil, Mibéfradil	Vérapamil	
Diurétiques	Furosémide		
Antihistaminiques H2	Cimétidine, Ranitidine		
Antibiotiques/macrolides	Érythromycine, Clarithromycine	Érythromycine, Clarithromycine	
Antifongiques imidazoles	Kétoconazole	Kétoconazole	
Antibiotiques/ antituberculeux	Rifampicine		Rifampicine
Antiépileptiques	Phénytoïne		Phénytoïne
Antiprotéases anti-VIH	Saquinavir, Indinavir, Ritonavir	Ritonavir	
Anthelminthiques	Ivermectine		
Antihistaminiques H1	Terfénadine		
Hormones stéroïdes	Estrogènes, Aldostérone, Corticostéroïdes	Tamoxifène	Dexaméthasone
Anti-émétiques	Ondansétron		
Antagonistes de la dopamine	Dompéridone		
Antigoutteux	Colchicine		
Antidiarrhéiques	Lopéramide		
Analgésiques	quelques opioïdes		
Sédatifs, Antidépresseurs	Midazolam	Midazolam	Millepertuis, Néfazodone
Aliments		Jus de pample- mousse	

#### e- Fonctions physiologiques:

Grâce à leur distribution tissulaire assez étendue, la Glycoprotéine-P semble avoir plusieurs fonctions, en plus de sa fonction de protection contre les xénobiotiques, dans l'organisme suivant dans quel tissu elle est exprimée (Cordon et al., 1994).

- **Métabolisme du cholestérol** : La Glycoprotéine-P pourrait avoir un rôle important dans la biosynthèse du cholestérol et son transport vers les tubules proximaux du rein (Liscovitch et Lavie, 2000).
- **Barrière hémato-encéphalique** : la Glycoprotéine-P agit comme une pompe d'efflux de glutamate dans cette barrière (Liu et Liu, 2001) et permet le transport de l'énaminone (un anti convulsant utilisé dans le traitement de l'épilepsie) affectant ainsi le traitement de cette pathologie (Cox et al., 2001).
- **Phospholipides-translocases** : La Glycoprotéine-P semble avoir la capacité d'agir comme une translocase de phospholipides, pouvant ainsi transporter la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et lasphyngomyéline (Higgins et Gottesman, 1992).
- **Résistance vis-à-vis des infections virales** : Divers recherches en virologie ont montré que

les cellules présentant le phénotype MDR et surexprimant la Glycoprotéine-P sont résistantes à l'infection des virus pénétrant dans la cellule à travers la membrane plasmique (**Raviv et al., 2000**). Cette étude suggère que la Glycoprotéine-P pourrait inhiber la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane provoquant ainsi la protection des cellules des infections assez grave le HIV (Human Immunodeficiency Virus) et le HSV (Herpes Simplex Virus).

## 2-ABCC1 :

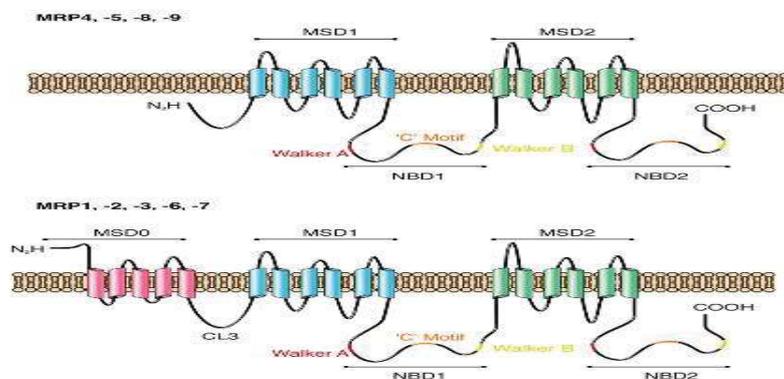
### a- Découverte de MRP1:

La protéine ABCC1 appelée aussi MRP1 a été découverte en 1992 par Cole et ses collaborateurs qui ont observé que le phénotype de la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques n'était pas lié seulement à la surexpression de la glycoprotéine-P.

Une analyse différentielle des ARNm des lignées résistantes suivis par de séquençage et clonage du gène responsable de ce phénotype MDR a montré l'expression d'un nouveau transporteur ABC initialement appelée MRP (multidrug résistance-associated protéine), est alors devenu le membre fondateur d'une grande sous-famille de la superfamille des transporteurs ABC, les MRPs (ABCC) (**Cole et al., 1992 ; Cole et Deeley, 1993**).

### b- Organisation structurale :

MRP1, codée par le gène ABCC1, est une glycoprotéine de 190 kDa et de 1531 acides aminés. La protéine MRP1 possède une structure proche de celle de la protéine ABCB1 avec  $6 \times 2$  hélices transmembranaires et deux domaines nucléotidiques communs aux ABC mais elle possède un domaine transmembranaire supplémentaire de 250 acides aminés comportant 5 hélices transmembranaires en position N-terminale reliées au TMD1 par une boucle cytosolique L0 (**Roger Get al., 2016**) (figure 24).

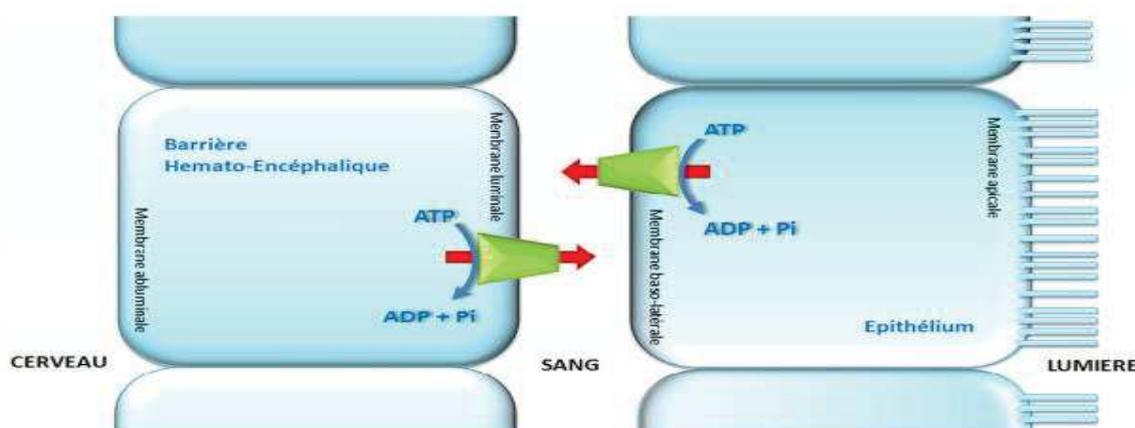


**Fig. 24:** Représentation schématique de la structure transmembranaire de la famille des ABCC

(**Roger et al., 2016**).

c- Localisations:

Comme la majorité des transporteurs ABC, le transporteur ABCC1 est exprimée probablement dans tout l'organisme, avec de hauts niveaux d'expression dans les poumons, les testicules, les reins, les cellules mononucléaires du sang, des muscles squelettiques, le placenta et les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Cole et al., 1992, Nies et al., 2004), le système circulatoire (Leslie et al., 2005), dans les lignées cancéreuses hépatiques (Roelofsen et al., 1997) et dans le plexus choroïde où il participe au filtre de la barrière cérébrospinale (Mercier et al., 2004). MRP1 est localisée aussi sur la membrane baso-latérale des cellules épithéliales des capillaires sanguins et sur la membrane luminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (figure 25).



**Fig. 25: Localisation de MRP1 dans les cellules polarisées et dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux.**

d- Fonctions physiologiques :

La diversité des substrats et la distribution étendue de MRP1 suggèrent la possibilité que ce transporteur soit probablement impliqué dans un grand nombre de fonctions biologiques. L'expression de MRP1 dans les tissus sains assure un rôle principal dans la détoxification de l'organisme et sa protection contre les xénobiotiques. Cependant grâce aux approches d'immunohistochimie, utilisant des anticorps spécifiques de MRP1, ont montré que ce transporteur présente une expression importante dans de nombreuses tumeurs solides, incluant les cancers du poumon, du sein et de la prostate.

➤ **Cancer du poumon:**

La survenue de cancer du poumon a été corrélée avec la surexpression de MRP1 dans plus de 75% de cas de cancer (**Sugawara et al., 1995; Nooter et al., 1996**).

Plus récemment deux études ont conclu que des niveaux élevés de MRP1 sont un indicateur négatif, impliquant une faible réponse aux traitements chimiothérapeutiques.

(**Hsia et al., 2002; Berger et al., 2005**).

➤ **Cancer du sein:**

De nombreuses études montrent que, en cas de cancer de sein, la surexpression de la protéine ABCC1 est corrélée avec un pronostic négatif. Nooter et ses collaborateurs ont montré aussi qu'une expression élevée de l'ABCC1 à un stade précoce de cancer du sein était associée à une rechute rapide après chimiothérapie (**Nooter et al., 1997**). Ces résultats ont été confirmés par des analyses de l'expression de MRP1 chez 500 femmes en période de pré-ménopause ayant un cancer du sein au premier stade. Cette étude indique une forte association entre l'expression de MRP1 et la réduction de l'espérance de vie.

➤ **Cancer de la prostate:**

Après sélection à la doxorubicine, les cellules issues de cancer de prostate présentent une expression forte en MRP1 et cette expression est dépendante de l'avancée du cancer (**Sullivan et al., 1998**), et elle est positivement associée avec le statut de la mutation p53 des tumeurs.

➤ **Neuroblastome:**

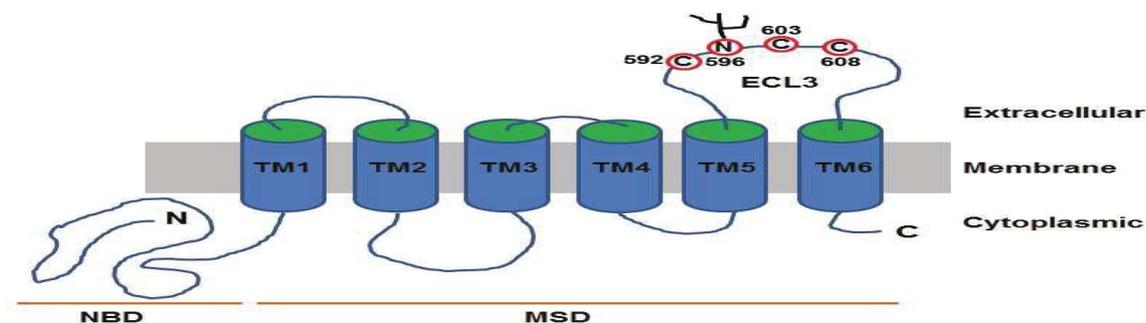
Le neuroblastome est une tumeur maligne solide extra-cérébrale la plus fréquente du jeune enfant (**Matthay et al., 1995**). Un des indicateurs moléculaires les plus importants dans la survenue de neuroblastome est l'amplification du gène NMYC (**Cotterill et al., 2000**). Harber et ses collaborateurs ont montré une forte corrélation entre l'expression du gène de MRP1 et l'amplification de NMYC, et ils ont considéré que la surexpression du MRP1 est probablement un indicateur négatif du pronostic (**Haber et al., 1999**).

e- MRP1 et les cancers hématologiques:

Divers analyses scientifiques portant sur l'implication de MRP1 dans les leucémies chroniques et aiguës montrent des résultats discordants. Dans les leucémies myéloblastiques aiguës (AML), l'expression de MRP1 n'est généralement pas un indicateur de réponse à la chimiothérapie. Cependant, elle peut être corrélée avec les différents stades de l'AML et peut-être de l'espérance de vie. Par contre, l'expression de MRP1 dans les leucémies lymphocytaires chroniques est en générale très élevée et peut avoir une signification clinique (Consoli et al., 2002).

**3- ABCG2 :**a- Découverte du transporteur :

La protéine ABCG2 est une petite protéine membranaire glycosylée de 655 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 72 kDa. Au contraire de la structure des protéines ABCB1 et d'ABCC1, le transporteur ABCG2 possède un seul domaine transmembranaire et un seul domaine de liaison aux nucléotides et fonctionne seulement après dimérisation (Wei et Ting, 2011). Elle est appelée BCRP pour Breast Cancer Resistance Protein puisque il a été clonée pour la première fois par Doyle (Doyle et al., 1998) à partir d'une lignée cancéreuse de sein résistante au vérapamil malgré la présence d'un inhibiteur de la Glycoprotéine-P (figure 26).



**Fig. 26:** Topologie membranaire de transporteur ABCG2 (Wei M et Ting Z, 2011).

b- Distribution tissulaire :

L'ABCG2 est principalement exprimé au niveau du placenta (Brechbuhl, 2010) ce qui suggère son rôle dans la protection du fœtus en effluant les drogues et les toxines du placenta vers la circulation sanguine de la mère (Maliepaard et al., 2001). Il est exprimé également au niveau du foie (Suzuki et al., 2003) et de l'intestin grêle (Maliepaard et al., 2001 ; Jonker et al., 2002). Le transporteur ABCG2 est aussi exprimé dans les glandes mammaires où il est responsable de l'approvisionnement en vitamines du lait (biotine, riboflavine) (Vlaming et al., 2009). Une étude récente a montré qu'il n'y avait pas d'expression d'ABCG2 dans certains tissus humains tels que le cœur et le muscle squelettique (Doyle et Ross, 2013).

c- Substrats d'ABCG2 et modulation:

Comme l'ABCB1, le transporteur ABCG2 est capable de transporter une grande variété de substrats (**Tableau 12**). Il a été montré que les cellules surexprimant ces transporteurs se caractérisent par une grande résistance à la mitoxantrone.

**Tableau 12: Substrats et inhibiteurs d'ABCG2**

Drogues anticancéreuses	9-aminocamptothécine, bisantrene, diflomotecan, doxorubicine, daunomycine, daunorubicine, épiburubine, étoposide, flavopyridol, GV 196771, irinotecan, methotrexate, mitoxantrone, NB-506, quinazoline, SN-38, imatinib, topotecan, teniposide 3
Nucléosides Lamivudine, zidovudine	
Composés naturels	Flavonoïdes, phéophorbide, porphyrines, estrogènes sulfatés
Substrats fluorescents	Hoechst 33342, Lysotracker, Rhodamine 123
inhibiteurs	Anticorps monoclonal anti-ABCG2 (5D3), inhibiteurs de protéases HIV, CI1033, futremorgrine C, GF120998, KO143, imatinib, pantoprazole, reserpine, gefitinib

Les deux inhibiteurs des ABCG2 les plus utilisés sont l'imatinib (Gleevec, ST1-571) et le gefitinib (Iressa, ZD1839) (**Nakamura et al., 2005**). A faible concentration (<1  $\mu\text{M}$ ), l'imatinib est transporté par l'ABCG2 et il est capable de stimuler l'activité ATPase (**Houghton et al., 2004**). A plus haute concentration, l'imatinib inhibe l'activité ATPase d'ABCG2 et ne se comporte pas comme un substrat d'ABCG2 (**Ozvegy-Laczka et al., 2004**).

d- Implication clinique d'ABCG2 :

Après avoir identifié le transporteur ABCG2 dans les cellules résistantes aux drogues, plusieurs équipes s'intéressent à l'étude de cette protéine, afin de déterminer son rôle dans le développement tumorale.

Ross et son équipe ont trouvé que 30% des patients atteints de leucémie myéloïde ont un fort taux d'ABCG2 et ils ont mis en évidence une relation entre l'expression d'ABCG2 et la résistance dans ce type de cancer (**Ross et al., 2000**).

L'analyse de l'expression de l'ABCG2 dans des prélèvements de 150 tumeurs non traitées révèle que ce transporteur est surexprimé dans 40% des échantillons, surtout dans les carcinomes du tractus digestif (colon, œsophage, estomac) (**Diestra et al., 2002; Diestra et al., 2003**), les métastases hépatiques, environ 65% des neuroblastomes (**Hirschmann-Jax et al., 2004**) et les tumeurs solides tel que le carcinome ovarien, le carcinome de poumon, le sarcome d'Ewing et le

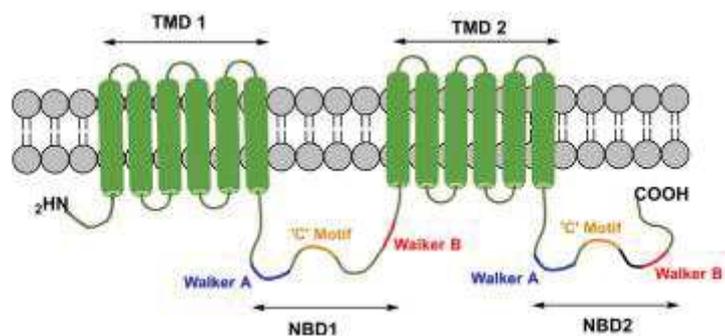
cancer de la prostate ( **Krishnamurthy et Schuetz, 2006**).

Ces résultats confirment alors le rôle crucial d'ABCG2 dans la résistance aux drogues et suggèrent que ce transporteur peut être le responsable des échecs thérapeutiques (**Candeil et al., 2004 ; Candeil et al., 2004 ; Mo et Zhang, 2012**).

#### 4-ABCC5:

##### a- Organisation structurale :

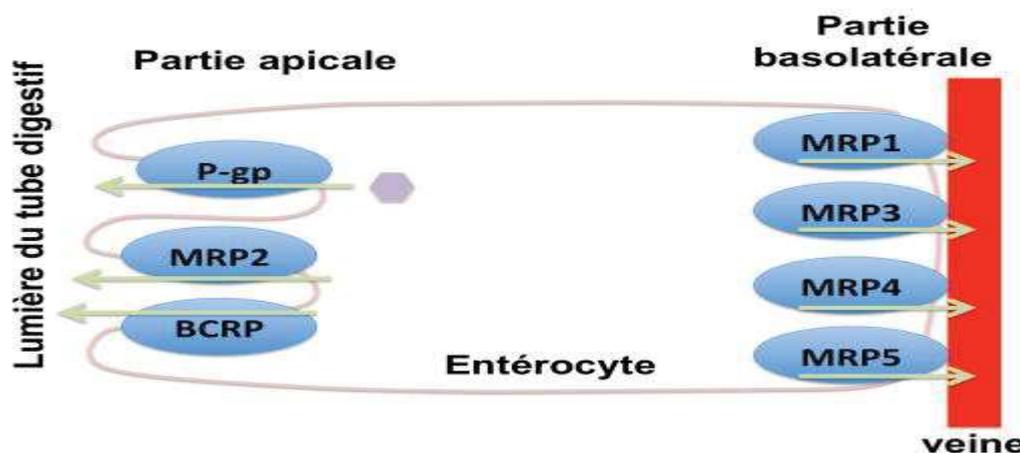
La protéine ABCC5 est une glycoprotéine de 161 kDa de la famille des MRP. Cette protéine possède une structure proche de celle de la protéine ABCC1 avec  $6 \times 2$  hélices transmembranaires et deux domaines TMD1 et TMD2 et deux domaines NBD1 et NBD2 (**Singh, 2016**)(figure 27).



**Fig. 27:** Topologie de ABCC5 (Singh N, 2016)

##### b- Localisations :

Comme la majorité des transporteurs ABC de la famille C, le transporteur ABCC5 est exprimé de façon ubiquitaire bien au niveau des tissus sains que des tissus cancéreux avec de hauts niveaux d'expressions au niveau des neurones, de système circulatoire, des cellules endothéliales, des capillaires cérébraux (**Jansen et al., 2015**) et sur la membrane baso-latérale des cellules épithéliales des capillaires sanguins (**Figure 28**).



**Fig. 28:** Localisation des transporteurs ABC dans une cellule polarisée.

c- Substrats des ABCC5:

Les protéines ABCC5 sont capables de transporter une large gamme de substrats dont principalement des anions organiques, des composés lipophiles conjugués au glutathion, glucuronidés ou sulfatés et des xénobiotiques.

d- Fonctions physiologiques :

Des études cliniques ont montré que la protéine MRP5 intervient dans l'efflux extracellulaire de cGMP (guanosine 3',5' monophosphate cyclique) (**Singh, 2016**) qui joue le rôle d'un messager intracellulaire impliqué dans la régulation de certaines fonctions biologiques (fonctions métaboliques, contractiles et sécrétoires). La diminution de cGMP est observée dans divers types de cancers tel que le cancer de l'estomac, le cancer du poumon, le cancer du côlon, le cancer du foie, le cancer de la prostate, le cancer du pancréas et le glioblastome (**Cesarini et al., 2017**) ce qui confère une importance majeure au ABCC5 comme cible pour traiter certains type de cancers (**Tableau 13**).

D'autre part des études montrent que le transporteur MRP5 peut intervenir dans la résistance aux médicaments anticancéreux tel que la thiopurine utilisée en cas de leucémie lymphoblastique aiguë, la 6-mercaptopurine et à la thioguanine, et au médicament anti-VIH 9- (2-phosphonylméthoxyéthyl) adénine (**Cesarini et al., 2017**).

**Tableau 13** : Maladies associées aux transporteurs ABC.

<b>Protéine</b>	<b>Nom commun</b>	<b>Médicaments Chimio-thérapeutiques expulsés par le transporteur</b>
<b>ABCA2</b>	ABC2	Estramustine
<b>ABCB1</b>	MDR1, P-gp	Colchicine, Doxorubicine, Etoposide, Vinblastine, Paclitaxel
<b>ABCC1</b>	MRP1	Doxorubicine, Daunomycine, Etoposide, Colchicine, Méthotrexate
<b>ABCC2</b>	MRP2	Vinblastine, Cisplatine, Doxorubicine, Méthotrexate
<b>ABCC3</b>	MRP3	Méthotrexate, Etoposide
<b>ABCC4</b>	MRP4	6-mercaptopurine et 6-thioguanine, Méthotrexate
<b>ABCC5</b>	MRP5	6-mercaptopurine et 6-thioguanine
<b>ABCC6</b>	MRP6	Etoposide
<b>ABCC11</b>	MRP8	5-fluorouracil
<b>ABCG2</b>	BCRP	Mitoxantrone, Topotécan, Doxorubicine, Daunomycine, Méthotrexate, Irinotécan, Imatinibe

---

## **CHAPITRE IV: IMMUNOTHERAPIE**

### **I-Généralités:**

Le traitement des tumeurs par immunothérapie consiste à mobiliser nos propres défenses contre les cellules cancéreuses. L'immunothérapie est actuellement l'une des voies de recherche les plus prometteuses en oncologie. Elle consiste à stimuler par différents traitements le système immunitaire afin de lui permettre de combattre les cellules tumorales. Il s'agit donc de réveiller le système immunitaire face au cancer (**Waldmann et al., 2003 ;Galluzi et al., 2015**).

L'efficacité de cette technique face à des tumeurs solides est enfin démontrée. Ces traitements ont montré des résultats pertinents dans plusieurs localisations tumorales, notamment le cancer du poumon, le mélanome et le glioblastome. Malheureusement, aujourd'hui, la majorité des patients ne répondent pas efficacement à ces traitements et la recherche doit continuer pour augmenter le nombre de personnes pouvant bénéficier des immunothérapies. Certaines pistes sont déjà prometteuses et de nombreux essais sont en cours pour allonger la liste des cancers qui peuvent être traités grâce aux immunothérapies (**Galluzi et al., 2015**).

### **II- Traitements immunothérapeutiques:**

Actuellement il existe plusieurs types de traitements immunothérapeutiques. Certains visent à stimuler le système immunitaire d'une façon très générale, alors que d'autres méthodes plus ciblées visent à attaquer spécifiquement les cellules cancéreuses.

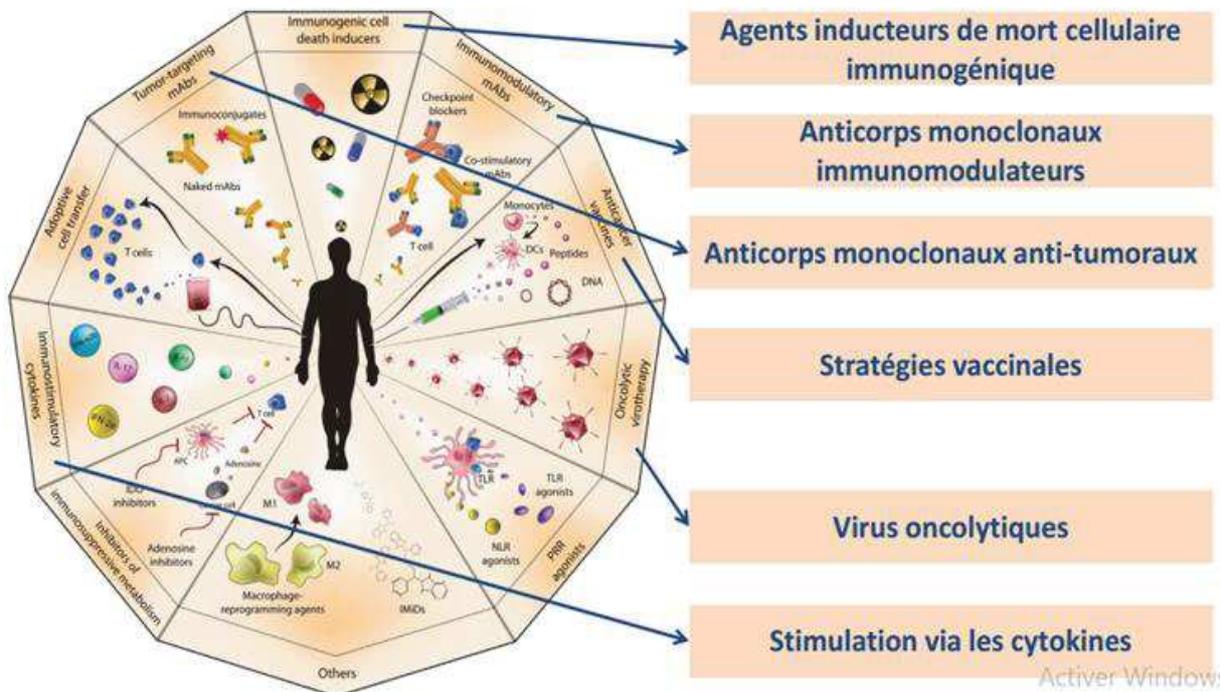
Les principaux types d'immunothérapies employées incluent (**figure 29**):

***Les anticorps monoclonaux*** : les anticorps monoclonaux sont similaires aux anticorps produits par le système immunitaire élaborés de façon à reconnaître et attaquer de manière spécifique certains composants des cellules cancéreuses.

***Les vaccins anticancéreux*** : la vaccination consiste à injecter des substances étrangères dans le corps pour activer le système immunitaire spécifique. L'idée de la vaccination anticancéreuse est de mettre au point des vaccins qui puissent être administrés une fois la maladie déclarée, lorsque la taille de la tumeur est encore suffisamment restreinte. Ce type de vaccins est actuellement testé pour combattre le mélanome et le prostate (**Le sipuleucel-T (Provenge)**).

***L'immunothérapie cellulaire*** : l'immunothérapie cellulaire consiste à utiliser les cellules du système immunitaire (surtout les lymphocytes) comme arme thérapeutique contre le cancer. Il peut s'agir de lymphocytes autologues (provenant du patient lui-même), qui doivent être activés au préalable, ou de lymphocytes allogéniques (provenant d'un donneur). On peut ainsi distinguer deux

principales approches : le transfert de lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux et l'utilisation de NK.



**Fig. 29:** Les différents types d'immunothérapies (Waldmann., 2003).

1-Molécules employées en immunothérapie:

Parmi les molécules employées, on trouve **(Randazzo et al., 2012):**

- Le rituximab qui est utilisé pour traiter les lymphomes résistant à la chimiothérapie.
- Le trastuzumab en cas de cancer du sein résistant en raison de la présence de récepteurs HER2 .
- L'ipilimumab (médicament Yervoy) et le pembrolizumab pour traiter les mélanomes ayant entraîné des métastases (car peu sensibles à la chimiothérapie) avec des résultats positifs de l'ordre de 20 % et avec 25 % de récives en moins.
- Le nivolumab (à base d'anticorps monoclonaux plus spécifiques que l'ipilimumab et qui ciblent des anticorps spécifiques avec donc moins d'effets secondaires), lui aussi contre les mélanomes mais également contre les cancers avancés du rein, du poumon et les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ;
- Le pembroliumab contre les mélanomes métastatiques (avec 30 % de résultats positifs et 12 % d'effets secondaires sévères).

### III- Système immunitaire et cancer:

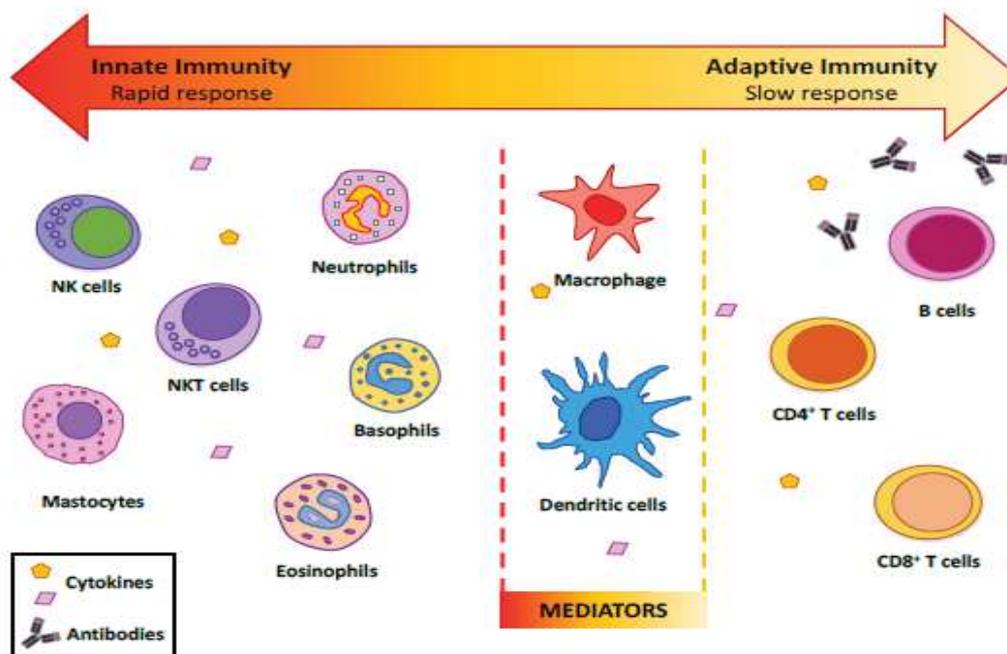
#### 1-Généralités:

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des mécanismes de défenses capable de protéger l'organisme et lui permettre de maintenir son intégrité (Parkin et Cohen, 2001).

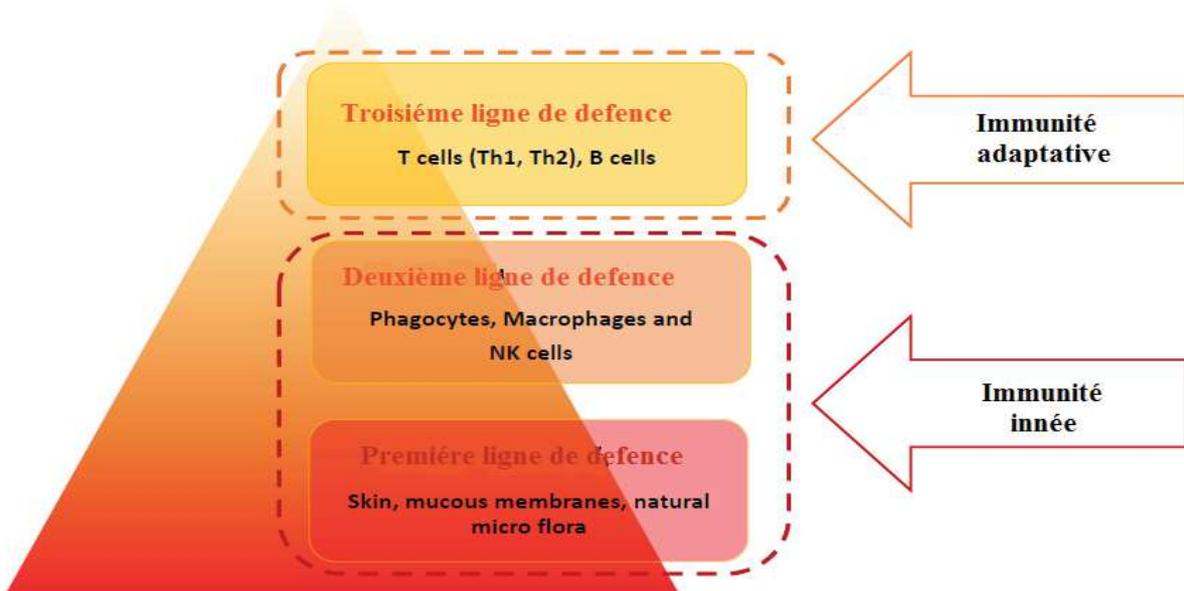
Le développement d'une réponse immunitaire se traduit par l'activation de 2 systèmes de défense qui assurent le mécanisme de l'immunosurveillance : une réponse innée ou naturelle qui constitue la première ligne de défense de l'organisme, et une réponse spécifique ou adaptative impliquant des réponses humorales et des réponses à médiation cellulaire (Zitvogel et al., 2006).

Notre système immunitaire est un système très complexe constitué de plusieurs types de cellules et composé de trois lignes de défense (figure 30). Les deux premières lignes constituent le système immunitaire innée (peau, cellules effectrices de l'immunité innée que les cellules T $\gamma\delta$ , les cellules Natural killer (NK), les cellules dendritiques (DC), les cellules T Natural killer (NKT)) et la troisième ligne est celle de l'immunité adaptative composée des cellules effectrices tel que les lymphocytes T et B (figure 31).

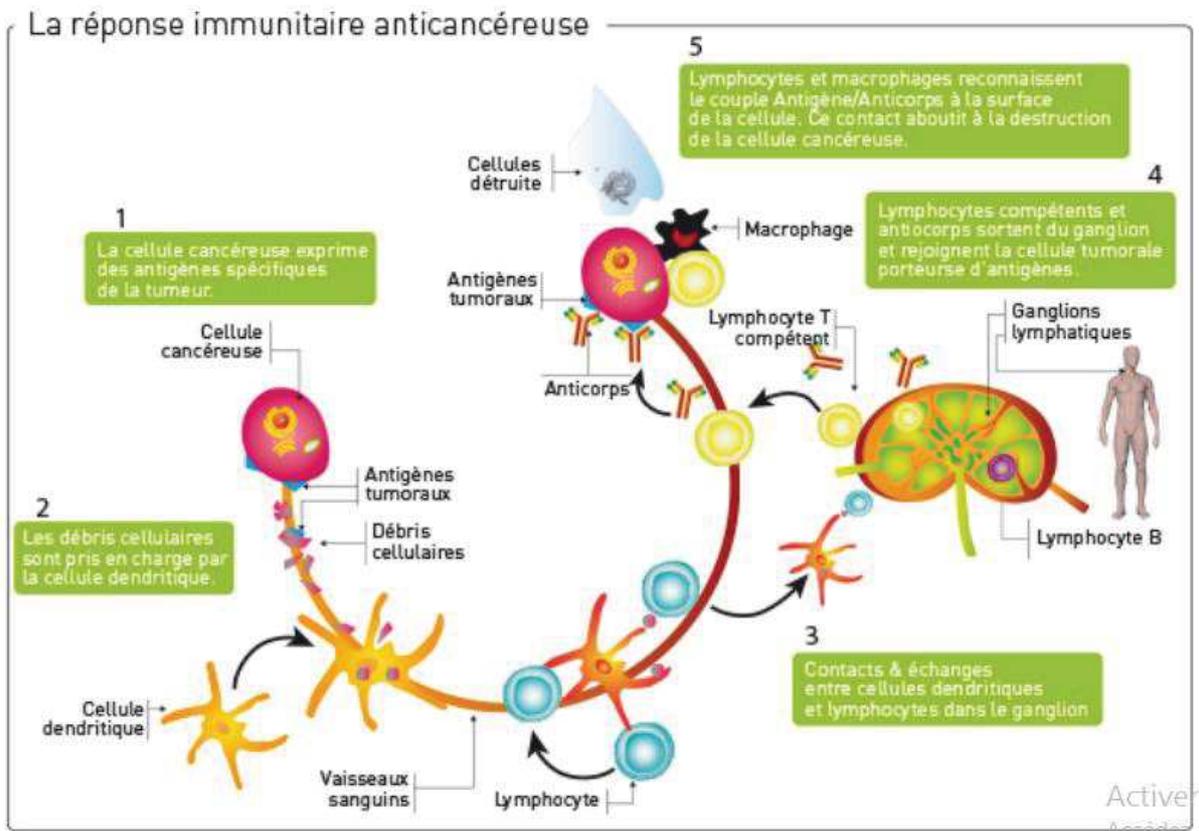
Ces cellules immunitaires sont produites par les organes lymphoïdes primaires (la moelle osseuse et le thymus) et sont véhiculées par la circulation sanguine et lymphatique (Escamilla, 2013) (figure 32).



**Fig. 30:** Immunité innée et adaptative.



**Fig. 31:** Les trois lignes de défense du système immunitaire.



**Fig. 32:** Les différentes phases de la réponse immunitaire anticancéreuse (Escamilla et al., 2013).

Lorsqu'une cellule est modifiée suite à l'introduction d'un corps étranger (infection virale ou bactérienne) ou par une molécule anormale que la cellule l'exprime après une mutation d'un gène par exemple, le système immunitaire est activé (**Parkin et Cohen, 2001**). Ce dernier est donc capable de détecter les cellules transformées (cancéreuses, infectées) et de les détruire avant qu'elles ne deviennent dangereuses. Ce phénomène est appelé immunosurveillance anti-tumorale (**Stroncek et al., 2013; Villalba et al., 2013**).

## 2- Immunosurveillance :

Cette théorie définit les relations entre les cellules transformées et le système immunitaire selon trois phases: l'élimination, l'équilibre, et l'échappement (**Dunn et al., 2002; Schreiber et al., 2011**) (**figure 33**).

***Dans la phase d'élimination***, les réponses immunitaires innées et adaptatives travaillent ensemble pour détruire les tumeurs bien avant qu'elles ne deviennent cliniquement apparentes. Si la réponse est efficace, le cancer peut être éliminé. Si, toutefois, ce n'est pas le cas, les cellules tumorales peuvent entrer dans ***la phase d'équilibre*** qui implique seulement des effecteurs de l'immunité adaptative. Lors de cette phase, l'immunogénicité des tumeurs est modifiée. Des variantes de cellules tumorales peuvent émerger car elles ne sont plus reconnues par l'immunité adaptative, elles deviennent insensibles à la réponse immunitaire effectrice, ou elles induisent un état immunosuppresseur dans le microenvironnement de la tumeur. Ces cellules tumorales peuvent alors entrer dans ***la phase d'échappement***, durant laquelle leur croissance n'est plus supprimée par l'immunité (**Schreiber et al., 2011**). Cette phase va permettre la survie de cellules tumorales et même leur croissance sans limitation par le système immunitaire. Les cellules cancéreuses subissent des divers modifications génétiques capables d'induire des modifications essentielles nécessaires pour contourner à la fois les défenses immunitaires innées et adaptatives (**Stroncek et al., 2013; Villalba et al., 2013**).

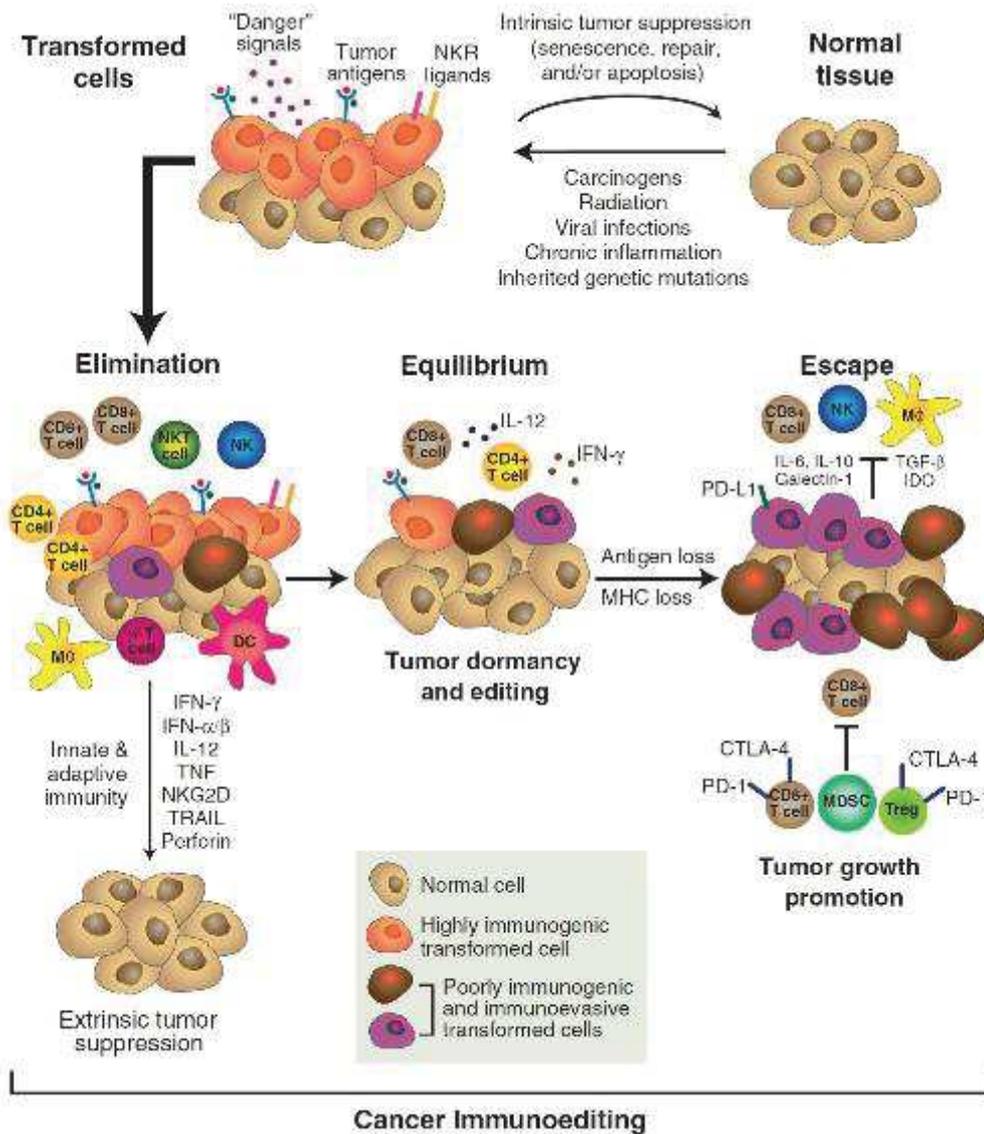
Les cellules cancéreuses parviennent à échapper à la surveillance du système immunitaire de différentes façons :

- perte de l'expression d'antigènes tumoraux, ou de molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) (**Aptsiauri et al., 2007; Campoli et Ferrone, 2008**).
- augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques (bcl-2, c-flip...),
- production de molécules immunosuppressives (TGF $\beta$ , IL-10, PGE2,IDO (Indoleamine 2,3-Dioxygenase) (**Julian et al., 2009**).
- recrutement dans le microenvironnement tumoral de cellules suppressives (lymphocytes T régulateurs, cellules myéloïdes suppressives, macrophages de type M2...). Ces dernières inhibent

l'activité des lymphocytes infiltrant les tumeurs. Elles produisent également des facteurs de croissance qui favorisent la prolifération tumorale. Elles peuvent aussi produire des molécules pro-angiogéniques (Lu et al., 2011).

- expression de molécules (Fas-L, PD-L1..) favorisant l'apoptose des lymphocytes (Villalba et al., 2013).

Tous ces phénomènes d'échappement et d'immunosuppression sont augmentés au cours de la progression de la maladie.



**Fig. 33:** Les trois étapes de l'immunosurveillance (Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011).

### 3- Les effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale:

#### **a- Les cellules dendritiques (DC):**

Les cellules dendritiques sont des cellules immunitaires qui possèdent des expansions cytoplasmiques appelées des dendrites, et elles sont présentes dans l'ensemble des tissus de l'organisme, plus spécifiquement au niveau de l'épiderme et au niveau du thymus. Elles ont deux origines, soit myéloïde, soit lymphoïde.

Bien que les cellules dendritiques présentent, comme les macrophages, des fonctions d'endocytose et de phagocytose et elles jouent encore le rôle de cellules présentatrices d'antigènes, ce que leur permet d'activer les lymphocytes (B et T) présents au niveau des organes lymphoïdes secondaires.

Dans le cas d'une réponse immunitaire anti-tumorale idéale, les DC internalisent les antigènes exogènes dans les tissus périphériques, puis migrent, sous l'influence de différents facteurs, jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Elles jouent donc un rôle principal dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

#### **b- Les lymphocytes T:**

Les lymphocytes T sont des cellules de l'immunité adaptative à médiation cellulaire, qui vise à détruire les cellules pathogènes, soit des bactéries ou des cellules cancéreuses. On distingue plusieurs types de lymphocytes T :

- Les LT CD8 qui évoluent en LT cytotoxique.
- Les LT CD4 qui donneront des LT helper (ou auxiliaires) qui ont un rôle de régulation de la réponse immunitaire adaptative par activation d'autres cellules immunitaires.

Les lymphocytes T CD4 reconnaissent, via leurs récepteurs spécifiques TCR, l'antigène au niveau des molécules de CMH de classe 2 de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et s'activent seulement si ce dernier signal est accompagné des signaux de co-stimulation via l'interaction de CD80/CD86 et du récepteur CD28 (**Dunn et al., 2004**)

Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) sont capables de reconnaître via le CMH les antigènes exprimés par les cellules tumorales. Ils peuvent lyser les cellules tumorales par un mécanisme de cytotoxicité dépendante de la perforine et des granzymes ou d'induction d'apoptose. De façon parallèle, ces cellules sont capables de sécréter de l'INF- $\gamma$ , qui polarise la réponse T vers une réponse Th1 (**Jeannin et al., 2011**).

**c- Les lymphocytes B:**

Les lymphocytes B sont des cellules de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale, qui vise à produire les anticorps spécifiques de l'agent pathogène.

Il existe différents mécanismes impliquant les anticorps spécifiques des antigènes tumoraux dans la mort des cellules tumorales. Le mécanisme principal est appelé cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody dependant cell cytotoxicity). Les anticorps liés aux cellules tumorales activent les cellules effectrices du système immunitaire. Les anticorps IgG se fixent via leur région Fc sur les macrophages ou sur les récepteurs CD16 des cellules NK. Cette fixation entraîne leur activation et la lyse des cellules tumorales **(Snijdwint F et al., 2001)**.

La liaison des antigènes de tumeurs aux anticorps peut aussi entraîner la cascade classique du complément et donc la lyse des cellules **(Livingston P et al., 2000)**.

**d- Les NKT:**

La cellule NKT (pour « *Natural Killer T* ») est une cellule intermédiaire entre la cellule NK et le lymphocyte T. Elle fait parti des lymphocytes puisqu'elles ont le même progéniteur lymphoïde au niveau de la moelle osseuse, mais contrairement à la cellule NK, elle présente les récepteurs TCR d'où leurs ressemblance au lymphocyte T.

Les cellules NKT peuvent reconnaître les glycolipides tumoraux présentés par les CPA via leur récepteur CD1d, signal capable de les activer. Les NKT activées libèrent de l'INF- $\gamma$ , et induisent la lyse des cellules tumorales via TRAIL et la perforine **(Morita et al., 1995; Nakagawa et al., 2000)**.

**e- Les cellules Natural Killer (NK):**

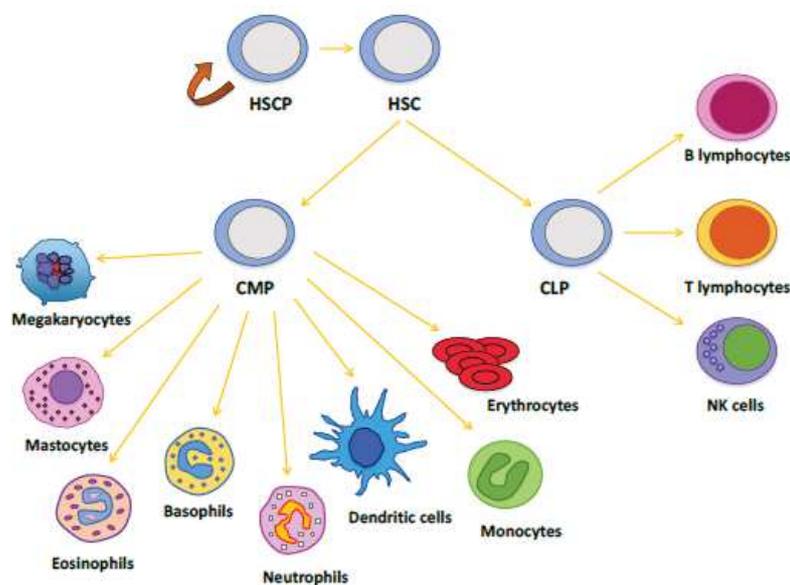
Comme leur nom indique les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée qui peuvent "tuer" sélectivement les cellules transformées (tumorales ou infectées) sans léser les cellules saines.

On va s'intéresser principalement à l'étude de ces cellules dans la suite de cette thèse.

**CHAPITRE V: LES CELLULES NK****I- Introduction:**

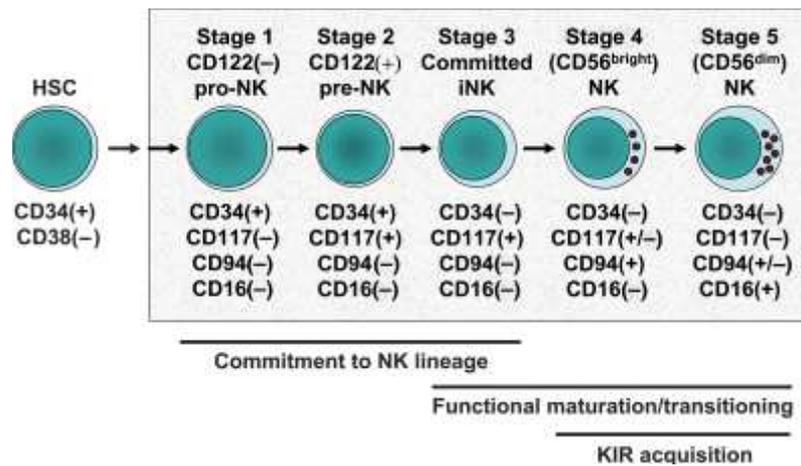
Les cellules Natural Killer (NK), découvertes au début des années 1970, sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire innée.

Elles représentent 5 à 20% des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, de *peripheral blood mononuclear cells*), mais peuvent représenter jusqu'à 30 à 50% des lymphocytes dans le foie (Freud et al., 2014; Vivier et al., 2008) . Chez l'adulte, les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34+ (Yu et al., 2013) (figure 34).



**Fig. 34:** Le développement des cellules sanguines à partir d'une cellule souche de sang pour les globules rouges et blancs (Aggarwal et Pittenger, 2005).

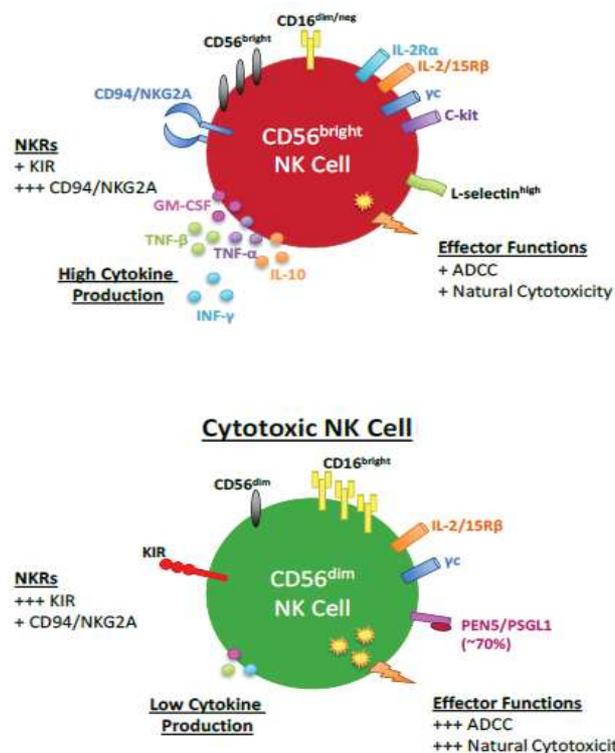
Un modèle de développement des cellules NK humaines *in vivo* composé de cinq stades a été proposé (Freud et Caligiuri, 2006) (Figure 35). Les trois premiers stades comportent des cellules engagées dans la lignée des cellules NK mais encore capables de se différencier en d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T et les DC myéloïdes (mDC). Les stades 4 et 5 signent l'entrée définitive dans la lignée des cellules NK.



**Fig. 35:** Modèle *in vivo* de développement des cellules NK humaines (Freud et al., 2006).

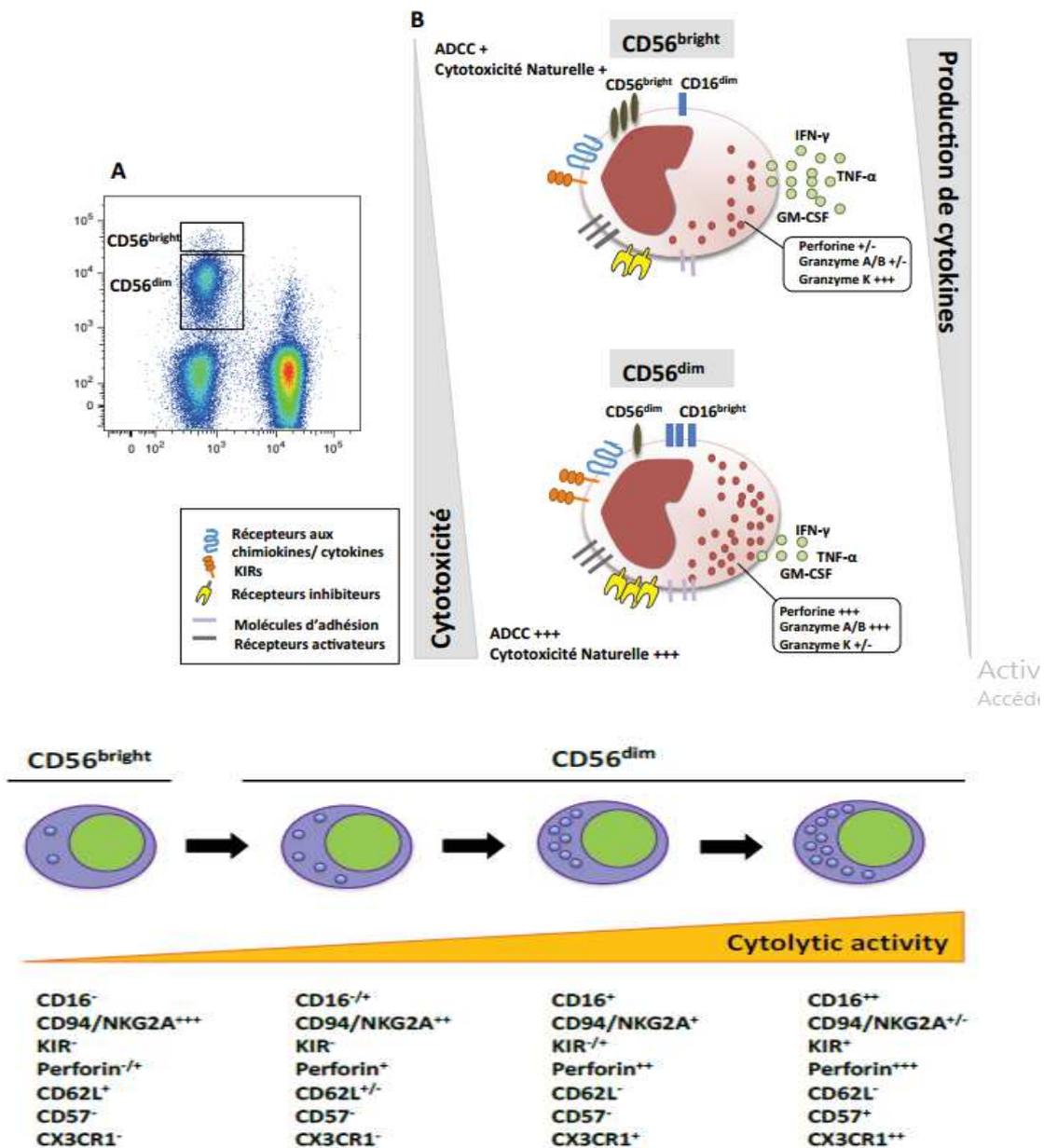
## II- Les sous populations des cellules NK:

Les cellules NK sont identifiées selon leur expression du CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> et CD3<sup>-</sup>, mais peuvent être distinguées davantage en trois sous-populations (Chan et al., 2007; Huntington et al., 2009; Juelke et al., 2010 ; Domaica et al., 2012;). Les cellules NK CD16<sup>Bright</sup> CD56<sup>Dim</sup> représentent 90%, les cellules CD16<sup>Dim</sup> CD56<sup>bright</sup> représentent 10% et les cellules CD16<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> représentent 1-3% des cellules NK au niveau périphérique mais leur fréquence augmente pendant certaines infections chroniques comme le VIH. (Farag et Caligiuri, 2006; Poli et al., 2009) (Figure 36).



**Fig. 36:** Classification des cellules NK selon l'expression de CD56 (Farag, 2006; Poli et al., 2009).

Il n'y a présentement aucune preuve directe, mais de nombreuses études suggèrent que les cellules NK  $CD16^{dim}CD56^{bright}$  sont les précurseurs des cellules  $CD16^{bright}CD56^{dim}$  (Yu et al., 2010; Beziat et al., 2010). D'abord, il a été démontré que les cellules NK  $CD16^{dim}CD56^{bright}$  possèdent des télomères plus longs que les cellules NK  $CD16^{bright}CD56^{dim}$  ce qui suggère qu'elles ont moins proliféré (Cooper et al., 2001 ; Farag et Caligiuri, 2006; Poli et al., 2009). Deuxièmement, contrairement aux cellules NK  $CD16^{bright}CD56^{dim}$ , les cellules  $CD16^{dim}CD56^{bright}$  expriment le CD117 mais n'expriment pas le CD57, deux récepteurs exprimés par les cellules progénitrices et sénescents, respectivement (Montaldo et al., 2013) (figure 37 et tableau 13).



**Fig. 37:** Représentation schématique de la différenciation des cellules NK (Montaldo et al., 2013).

**Tableau 14** : Caractérisations des cellules NK CD56<sup>Bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> .

	CD56 <sup>bright</sup>	CD56 <sup>dim</sup>
<b>CD56</b>	++	+
<b>CD16</b>	±	++
<b>Inhibitory receptors</b>		
KIR	-	+
ILT2	-	+
CD94/NKG2A	++	±
<b>Activating receptors</b>		
NKp46	++	+
CD117 (c-kit)	++	-
<b>Cytokine receptors</b>		
IL2R $\alpha\beta\gamma$	+	-
IL2R $\beta\gamma$	++	+
IL1R1	++	+
IL18R	++	+
<b>Chemokine receptors</b>		
CCR7	++	-
CXCR3	++	±
CXCR1	-	++
CX3CR1	-	++
<b>Adhesion molecules</b>		
CD2	++	±
CD11c	++	±
CD44	++	+
CD49e	++	+
CD54	++	±
CD62L	++	±
CD11a	+	++
<b>Other molecules</b>		
CD57	-	+
CD160	-	++
CD55	++	+
CD59	++	+
HLA-DR	+	-

### III- Les fonctions effectrices des cellules NK:

#### 1- La cytotoxicité:

Comme leur nom le signifie en tant que "tueuses naturelles" les cellules NK sont capables d'induire des fonctions effectrices directes face aux cellules altérées (infectées ou tumorales) sans léser les cellules saines du soi.

Grâce à la grande diversité des récepteurs exprimés à leurs surfaces, les cellules NK peuvent reconnaître les cellules infectées ou tumorales grâce à la détection de la baisse d'expression des molécules du CMH-I, et/ou l'identification de molécules de stress ou de ligands d'origine virale par des récepteurs activateurs. Cette reconnaissance active les cellules NK d'où la destruction des cellules cibles. Cette fonction est nommée « cytotoxicité naturelle » (Vivier et al., 2013) assuré par l'activation de la voie perforine/granzymes (Anthony et al., 2010). L'exocytose de granules cytotoxiques est un mécanisme commun aux cellules NK et aux LTCs. A la différence des LTCs

qui synthétisent les granules seulement après rencontre avec l'antigène spécifique, les cellules NK forment les granules au cours de leur développement ce qui leur permettant ainsi de répondre très rapidement face à une cellule tumorale ou infectée (**Colucci et al., 2003**).

## 2- La production de cytokines :

Les cellules NK ne sont pas simplement, comme leur nom signifie, des cellules tueuses naturelles de l'immunité innée, mais également des cellules qui interviennent dans la régulation des réponses inflammatoires et la mise en place des réponses immunes adaptatives (**Fauci et al., 2005**) grâce à leur capacité à produire des cytokines et des chimiokines.

### **a- Les cytokines:**

Une fois activées, les cellules NK produisent majoritairement de l'IFN- $\gamma$  (Interferon gamma) mais aussi du TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (Transforming growth factor), GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), IL-3, -5, -8, -10 et -13(IL: Interleukine) (**Cooper et al., 2001**). Les cytokines produites dépendent des conditions de stimulation et des cytokines présentes dans l'environnement.

-La production d'IFN- $\gamma$  oriente la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1, active les cellules présentatrices de l'antigènes (CPA) et augmente l'expression des molécules de CMH de classe I (**Wallach et al., 1982**). De plus, l'IFN- $\gamma$  joue un rôle antiprolifératif sur les cellules infectées, malignes ou transformées et capables d'activer les macrophages afin d'éliminer les pathogènes (**Filipe-Santos et al., 2006 ; Maher et al., 2007**).

-Le microenvironnement riche en IL-12 et l'IL-15 favorise une production importante d'IL-10 tandis que l'IL-15 associée à l'IL-18 induit la production de GM-CSF, TGF- $\beta$  et de l'IL-13 (**Cooper et al., 2001**).

-Le GM-CSF est important pour la maturation des cellules dendritiques et des macrophages ainsi que pour la prolifération des polynucléaires (**Tarr et al., 1996**).

-Le TGF- $\beta$  et l'IL-10 sont deux cytokines produites tardivement, qui jouent un rôle important dans la modulation de la réponse inflammatoire (**Banchereau et Steinman, 1998; Wallace et Smyth, 2005**).

### **b- Les chimiokines:**

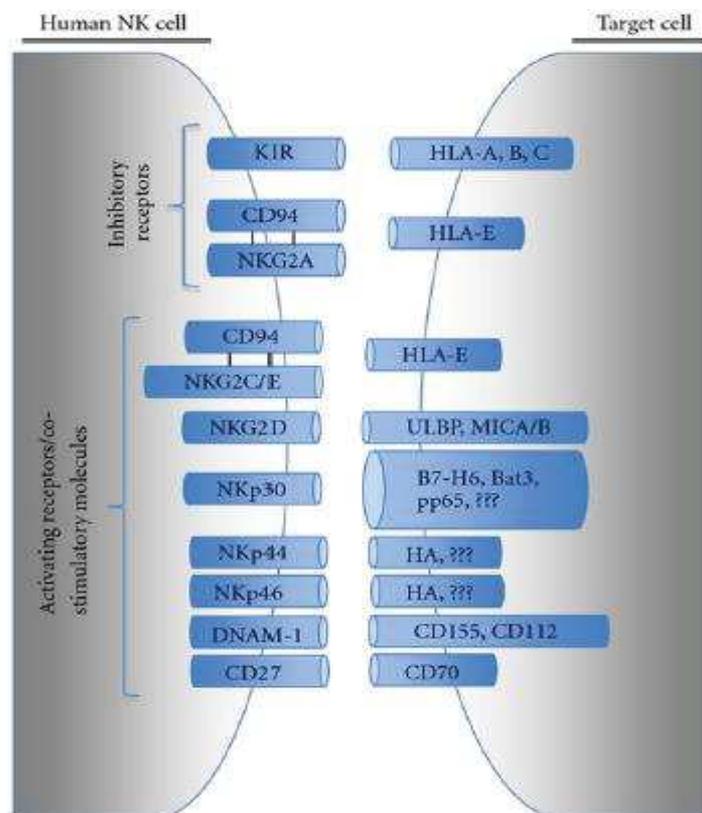
La fonction principale des chimiokines est de faire appel aux autres populations cellulaires sur le site de l'inflammation (**Maghazachi et al., 2002**). Leur production est rapide et précède celle des

cytokines (Lum et al., 2004). Elle est déclenchée principalement par l'IL-12/IL-18, IL-12/IL-15 ou par les cellules cibles.

**IV- Les récepteurs des cellules NK:**

Contrairement aux lymphocytes T et B, les cellules NK n'expriment pas de récepteurs spécifiques d'antigènes mais sont néanmoins capables de moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives et de lyser les cellules tumorales et infectées. Ces deux fonctions sont régulées par l'équilibre entre les signaux reçus par les récepteurs inhibiteurs et activateurs exprimés à la surface des cellules NK (Alvarez-Breckendrige et al., 2012) (Figure 38).

On distingue classiquement deux familles de récepteurs NK : les récepteurs inhibiteurs (Tel que KIR-L (killer cell immunoglobulin-like receptors-Long), LIR/ILT (Leucocyte Immunoglobulin-like Receptor/Immunoglobulin-like Transcript) et les récepteurs activateurs (tel que CD16, NKp46, DNAM1, NKG2D...). Cette dualité doit plutôt être perçue sous forme de complémentarité dans le sens où les réponses reçues par les NK sont contrôlées par une balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs transmis par les différentes familles de récepteurs (Vivier et al., 2011).



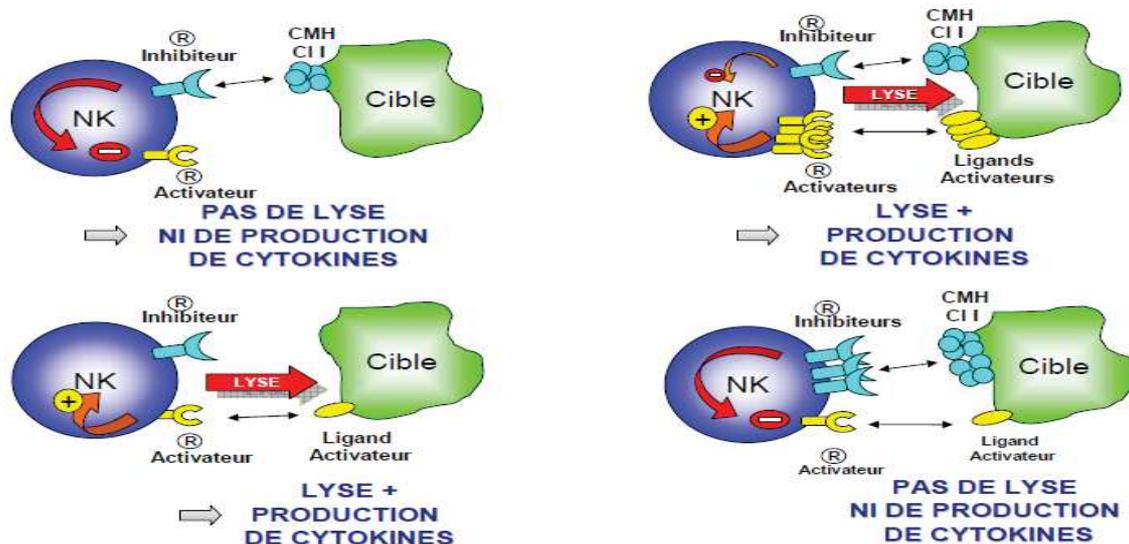
**Fig. 38:** Les récepteurs ces cellules NK (Alvarez-Breckendrige et al., 2012).

1- Régulation du seuil d'activation des cellules NK:

La régulation de l'activation des cellules NK est dépendante d'une balance entre des signaux activateurs et inhibiteurs déclenchés par les différents récepteurs des NK. On distingue schématiquement 4 situations (**figure 39**):

- (i) Une cellule n'exprimant aucun ligand des récepteurs inhibiteurs ou activateurs, c'est le cas de l'érythrocyte. La cellule NK est alors inhibée.
- (ii) Une cellule cible normale exprime à sa surface des molécules du CMH-I reconnues par un récepteur inhibiteur NK : la cytotoxicité naturelle de la cellule NK est alors inhibée.
- (iii) Une cellule cible exprime des ligands pour les récepteurs activateurs mais n'exprime pas ou peu de molécules du CMH-I : il n'y a pas d'inhibition du signal activateur, la cellule est donc lysée
- (iv) Une cellule cible stressée exprime de façon anormale des ligands reconnus par les récepteurs activateurs mais n'a pas perdu l'expression des molécules du CMH-I : le signal inhibiteur bloque l'activation et la cytotoxicité naturelle.

Dans cette situation, le signal inhibiteur peut être levé lorsque la densité en ligands activateurs ou l'affinité récepteurs/ligands est importante.



**Fig. 39: Régulation du seuil d'activation des cellules NK.**

2- Les récepteurs inhibiteurs:

Les récepteurs inhibiteurs appartiennent à deux grandes familles moléculaires de glycoprotéines membranaires : la superfamille des immunoglobulines qui comprend les KIR-L (killer cell immunoglobulin-like receptors Long), et les LIR/ILT (Leucocyte Immunoglobulin-like

Receptor/Immunoglobulin-like Transcript) et la superfamille des lectines de type C qui comprend les complexes CD94/NKG2A et CD94/NKG2B.

Les plus étudiés d'entre eux reconnaissent les molécules CMH de classe I du soi exprimées à la surface de quasiment toutes les cellules saines. En situation normale (non pathologique), les cellules NK « voient » le CMH de classe I sur les cellules saines et sont inhibées. Ce mécanisme garantit que les cellules saines soient préservées de la cytotoxicité des NK. Une baisse d'expression des molécules CMH de classe I est perçue comme une modification de l'équilibre des signaux inhibiteurs/activateurs, et conduit à l'activation des fonctions effectrices NK (**tableau 13**).

### 3-Les récepteurs activateurs :

Bien que l'expression des molécules CMH de classe I paraisse indispensable pour l'activité des cellules NK, plusieurs recherches ont montré que certaines cibles cellulaires (notamment les érythrocytes) n'expriment pas les molécules du CMH-I et ne sont cependant pas lysées par les cellules NK. Cela suppose qu'en plus de la levée de l'inhibition, un signal activateur soit nécessaire (**tableau 13**). Plusieurs familles de récepteurs activateurs ont alors été mises en évidence tel que :

#### **a- La superfamille des immunoglobulines (Ig):**

##### -CD16a

Le récepteur CD16a est codé par un gène localisé sur le chromosome 1. Il est exprimé sur tous les cellules NK CD56<sup>dim</sup>, une fraction des NKCD56<sup>bright</sup> et une faible proportion de lymphocytes T- $\gamma\delta$ , mais aussi sur les monocytes et les macrophages.

##### -DNAM-1

Ce récepteur est codé par un gène situé sur le chromosome 18. Il est exprimé à la fois sur les cellules NK et les cellules T CD8 d'où il participe à l'interaction des cellules NK avec les cellules tumorales. Ils sont aussi exprimés sur la surface des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques (**Shibuya et al., 1996 ; Bottino et al., 2003**).

#### **b- La famille des NCR (Natural Cytotoxicity Receptors) :**

Les récepteurs de la cytotoxicité naturelle (NCR), récemment décrites par Kruse et son équipe, représentent une famille de molécules exprimées à la surface des cellules NK humaines incluant NKp30, NKp44 et NKp46 (**Kruse et al., 2014**).

### c- La famille des lectines de type C:

**-NKG2C:** faiblement exprimé sur les cellules NK CD56<sup>bright</sup> et CD56<sup>dim</sup> d'un individu sain (**Kusumi et al., 2006**). Il est augmenté au cours de différentes infections dont celle médiée par le cytomégalo virus humain (HCMV), le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'immunodéficience humaine de type-1 (VIH-1) et les Hantavirus (**Hendricks et al., 2014; Beziat et al., 2014 ; Fausther-Bovendo et al., 2008 ; Oliviero et al., 2009; Björkström et al., 2011**).

**-NKG2E:** reste très peu étudié à ce jour à cause de l'absence d'anticorps spécifiques pour la cytométrie.

**-NKG2F:** possède un domaine cytoplasmique et un segment transmembranaire mais pas de domaine extracellulaire (**Plougastel et al., 1997**). Il ne s'associe pas au CD94 et transmet un signal activateur mais sa fonction exacte reste encore inconnue (**Kim et al.2004**).

**-NKG2D:** c'est un récepteur activateur appartenant à la famille des lectines mais qui a très peu d'homologie avec les autres NKG2 (**Houchins et al., 1991; Wu et al., 1999**).

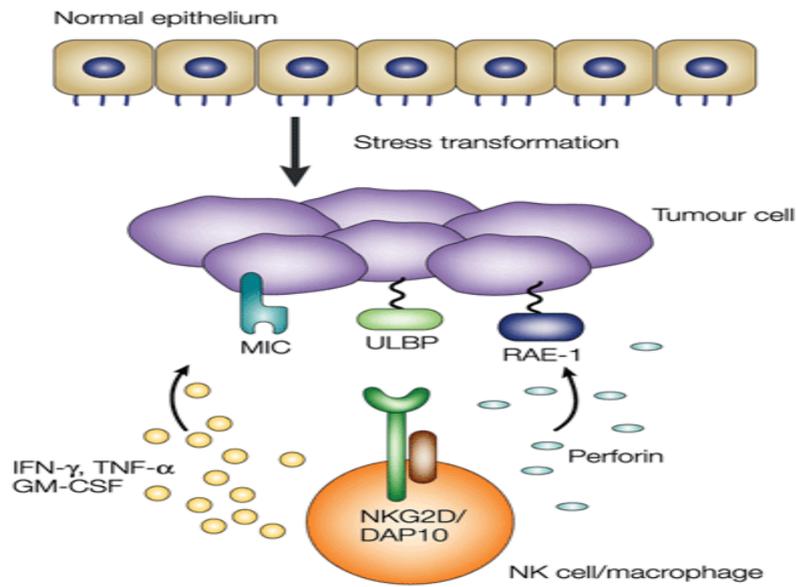
On va s'intéresser à l'étude de ce type de récepteurs dans le reste de manuscrit.

#### 4- Le récepteur NKG2D (Natural-Killer group 2 D):

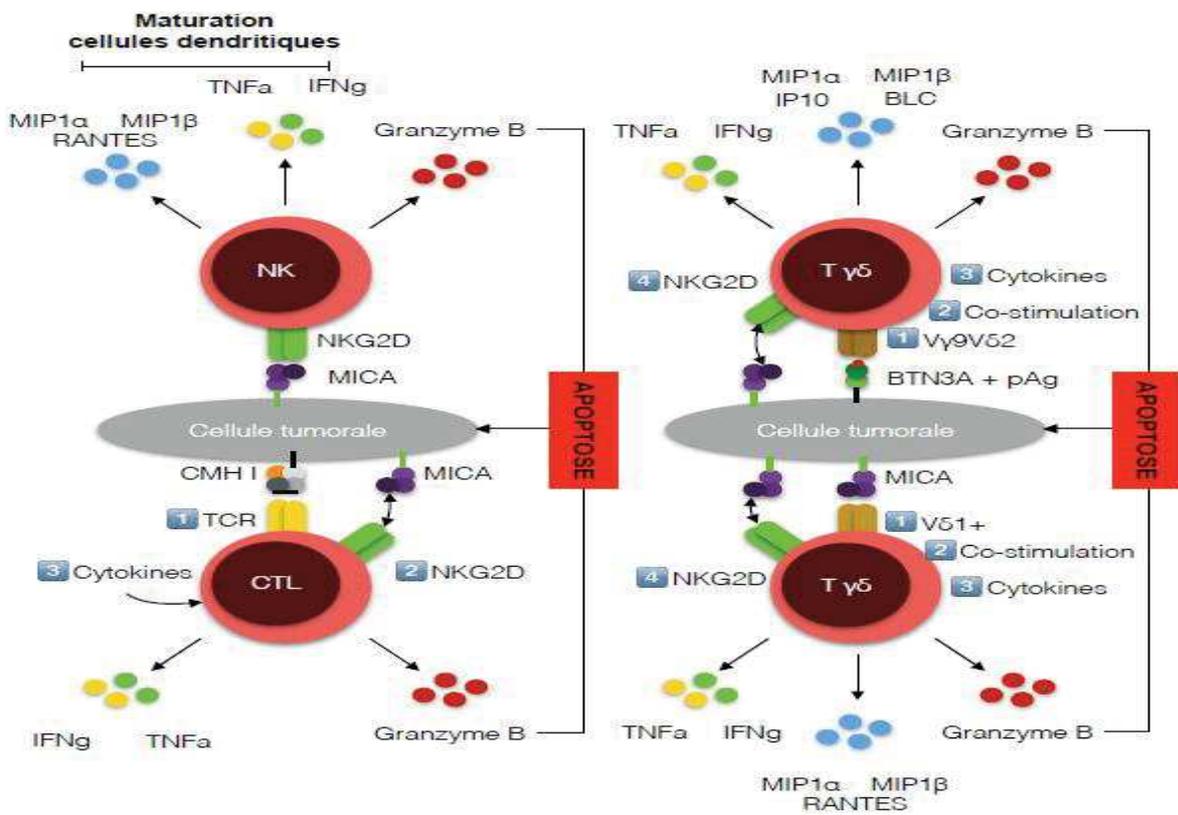
NKG2D est un récepteur transmembranaire activateur codé par un gène situé sur le chromosome 12 (**Mistry et al., 2007**). Il s'agit d'un homodimère exprimé à la surface de toutes les cellules NK, d'une partie des LT- $\gamma\delta$  et T-CD8  $\alpha\beta$  ainsi que sur une sous population de lymphocytes T CD4+ (**Gonzalez et al., 2006**).

Chez l'Homme, NKG2D reconnaît et interagit avec une grande diversité de ligands de stress présentant des homologies de structures avec les CMH-I tel que MIC-A, MIC-B (Major histocompatibility complex class I related chain A et B), ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3 et ULBP-4 (UL16 binding protein) (**Chalupny et al., 2003; Bauer et al., 1999; Raulet et al., 2013**). Ces molécules sont absentes sur les cellules normales mais sont exprimées à la surface des cellules transformées lors d'un stress cellulaire (transformation tumorale, infection virale, lésion de l'ADN (**Gonzalez et al., 2006**) (**figure 40**).

NKG2D permet donc aux cellules NK de détecter les modifications cellulaires induites par des processus pathologiques infectieux, tumoraux, liés à des carcinogènes, à des chocs oxydatifs ou thermiques (**Mistry et al., 2007**). Globalement, l'engagement des récepteurs activateurs a pour conséquence le déclenchement de la cytotoxicité naturelle et de l'ADCC par les cellules NK. Ceci peut également entraîner leur stimulation, prolifération et production de cytokines (**figure 41**).



**Fig. 40:** Représentation schématique de l'action des NK contre les cellules tumorales (Lanier et al., 2001).



**Fig. 41 :** Fonctions du récepteur NKG2D exprimé par les NK, les T CD8+ et les T gamma-delta.

**Tableau 15:** les récepteurs des NK , leurs ligands et leurs expressions (Montaldo et al., 2013).

	NAME	CLUSTER OF DIFFERENTIATION	LIGANDS	EXPRESSION
ADHESION MOLECULES	1. LFA-1 2. LFA-2 3. LFA-3 4. αMβ2	CD11a/CD18 CD2 CD58 CD11b/CD18	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 CD58, CD48 CD2 C3bi, fibrinogen, ICAM-4	CD56 <sup>dim</sup> NK cells From the pNK stage on  80% of circulating NK, up-regulated Upon activation (fundamental in synapse formation) Heterogeneous expression From the iNK stage on
	5. αXβ2 6. N-CAM	CD11c/CD18 CD56	C3bi, fibrinogen, ICAM-1 FGFR1 (stimulating maturation)	CD56 <sup>dim/-</sup> NK subset
	7. Human NK-1 (HNK-1) 8. L-selection	CD57 CD62L	??? GlyCAM-1 MadCAM-1	CD56 <sup>bright</sup> and subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells
INHIBITORY RECEPTORS	1. LIR/ILT2 2. KIR2DL1 3. KIR2DL2/3 4. KIR2DL4 <sup>a</sup> 5. KIR3DL1 6. KIR2DL5 7. KIR3DL2 8. NKG2A/KLRD-1 9. IRp60 10. p75/AIRM1 (Siglec7)	CD85j CD158a CD158b CD158d <sup>a</sup> CD158e1 CD158f CD158k CD159a/CD94 CD300a CD328	HLA-1, UL-18 (CMV) HLA-C2 HLA-C1 HLA-G HLA-Bw4 ??? HLA-A*03 and *11, CpG-ODN HLA-E  a2,8-linked disialic acid	Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells All mature CD56 <sup>dim</sup> NK cells?? Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Heterodimer present from the iNK stage on Virtually all mature NK cells Virtually all mature NK cells
ACTIVATING RECEPTORS	1. FcγRIIIa 2. KIR2DS1 3. KIR2DS2/3 4. KIR2DL4 <sup>a</sup> 5. KIR3DS1 6. KIR2DS5 7. KIR2DS4 8. NKG2C/KLRD-1 9. NKRP-1  10. DNAM-1 11. 2B4 12. NKG2D 13. Nkp46 14. Nkp44 15. Nkp30 16. NTB-A 17. Nkp80	CD16a CD158h CD158j CD158d <sup>a</sup> CD158e2 CD158f CD158i CD159c/CD94 CD161  CD226 CD244 CD314 CD335 CD336 CD337 CD352	IgG HLA-C2 ??? HLA-G HLA-Bw4 (?) ??? HLA-A*11 and some HLA-C alleles HLA-E LLT-1  Nectin-2 (CD112) PVR (CD155) CD48 MIC-A, MIC-B, ULBPs ?? Viral HA HN ?? Viral HA HN B7-H6 NTB-A AICL (activation-induced C-type lectin)	Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells All mature CD56 <sup>dim</sup> NK cells?? Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells Subsets of circulating NK cells iNK cells and mature NK cells; activating function confined to iNK cells Virtually all mature NK cells iNK SAP <sup>+</sup> , mNK SAP <sup>+</sup> (coreceptor) Subsets of CD56 <sup>dim</sup> NK cells CD56 <sup>dim</sup> resting and activated mature NK cells CD56 <sup>dim</sup> activated NK cells (iNK and mNK) CD56 <sup>dim</sup> resting and activated mature NK cells (Coreceptor) Virtually all mature NK cells
CYTOKINES AND CHEMOKINE RECEPTORS	1. IL-2Rα (high affinity receptor) 2. IL-2Rβ/IL-2Rγ (intermediate affinity receptor) 3. c-Kit  4. IL-7Rα 5. CXCR1 6. CXCR3 7. CXCR4 8. CCR4  9. CCR7 10. IL-18R 11. ChemR23 12. CX3CR1	CD25 CD122/CD132  CD117  CD127 CD128 CD183 CD184 CD194  CD197 CD2018a	IL-2  IL-2 and IL-15  SCF (KL)  IL-7 IL8 CXCL9, CXCL10, CXCL11 CXCL2 CCL2, MIP-1β (CCL4), RANTES, CCL17, CCL22 CCL19, CCL21 IL18 Chemerin Fractalkine	CD56 <sup>bright</sup> NK cells  Virtually all mature NK cells  Appear at the beginning of NKP stage and disappear in CD16 <sup>bright</sup> subset CD56 <sup>bright</sup> NK cells CD56 <sup>dim</sup> NK cells CD56 <sup>bright</sup> and CD56 <sup>dim</sup> NK cells CD56 <sup>bright</sup> and CD56 <sup>dim</sup> NK cells  CD56 <sup>bright</sup> NK cells  CD56 <sup>dim</sup> NK cells CD56 <sup>dim</sup> NK cells
DEATH RECEPTORS AND LIGANDS	1. Fas or Apo1 2. Fas ligand 3. CD40L 4. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)	CD95 CD95L CD154 CD253	CD95L CD95 CD40 DR4 (TRAIL-R1), DR5 STRAIL-R2)	Activated NK cells (causes self apoptosis) Activated NK cells (induces target apoptosis) Activated NK cells (induces target apoptosis) Activated NK cells (induces target apoptosis)
OTHER ANTIGENS	1. LAMP-1 2. TNFRSF7	CD107a CD27	- CD70	Marker of degranulation, expressed on the inner surface of the cytotoxic granule membrane CD56 <sup>bright</sup> NK cells

Activer Win  
Accédez aux pa  
activer Window

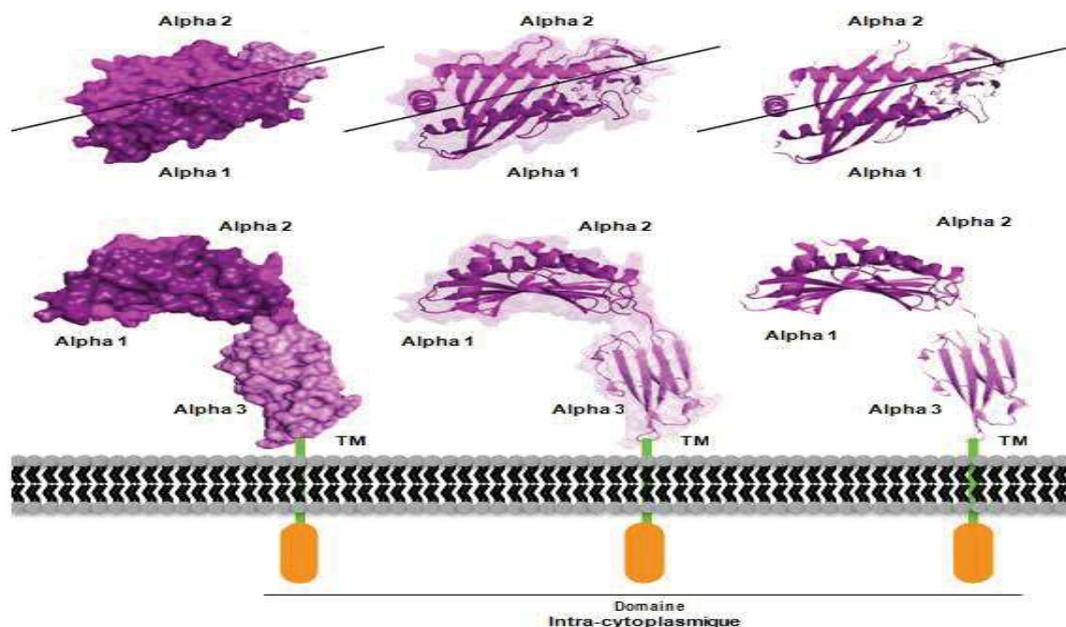
#### 4.1- Les protéines MICA et MICB :

##### a- Généralités:

Les protéines MICA et MICB humaines sont codées par 2 gènes polymorphes qui appartiennent à une famille multigénique localisée sur le chromosome 6 chez Homo sapiens (6p21.3) (Nalabolu et al., 1996), à proximité du gène HLA-B (Bahram et al., 1994). Les gènes MIC sont composés de 7 gènes (MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MICE et MICG) ; leur taille est supérieure de 12kb à celle des gènes CMH-I (Bahram et al., 1994), et leur région 5' flanquante comporte des éléments de régulation de choc thermique similaires aux éléments régulateurs en amont du gène hsp70 (Groh et al., 1996). Le gène MICA comme le gène MICB, est exprimé chez les mammifères à l'exception des certains rongeurs.

Seuls les gènes MICA et MICB sont traduits en protéines, les autres étant des pseudo gènes.

D'un point de vue structural, MICA est composé de trois domaines structuraux distincts : trois domaines alpha (alpha 1, alpha 2, alpha 3) (figure 42).



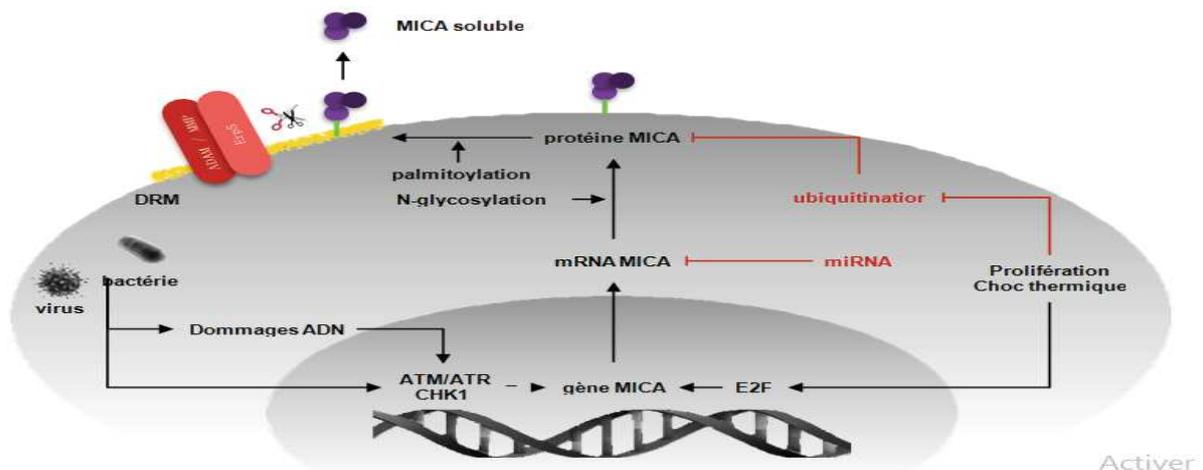
**Fig. 42 :** Structure 3D des domaines extracellulaires de MICA (Valés-Gómez,2015).

Les protéines MICA/B sont positivement régulées en réponse au stress cellulaire dans les cellules transformées (Dienfach et al., 2000) et les cellules infectées (Jinushi et al., 2003). A la suite de l'interaction MICA;B/NKG2D, les cellules NK sont activées grâce à la protéine DAP10 couplée aux récepteurs NKG2D (Wu et al., 1999). Ce signal d'activation domine le signal inhibiteur induit par la reconnaissance de NKG2D par les protéines CMH-I (Dienfach et al., 2000).

### b- Expression cellulaire et tissulaire des protéines MICA/B :

L'expression des protéines MICA/B sur la membrane des cellules, en conditions physiologiques normales, est restreinte à un petit nombre de cellules tel que les cellules épithéliales intestinales (Groh et al., 1996), les fibroblastes, les cellules endothéliales, les monocytes, les kératinocytes (Zwirner et al. 1998) (Zwirner et al., 1999), les macrophages (Nedvetzki et al., 2007) et les cellules dendritiques (Jinushi et al., 2003). Plus récemment, il a été montré que les lymphocytes T actives présentent une expression des molécules MICA/B (Cerboni et al., 2007). Bien que l'expression de MICA/B dépend principalement de type cellulaire, elle est soit constitutive à la surface des cellules (endothéliales, épithéliales, et des fibroblastes) soit induite suite à un signal activateur à la surface des cellules (Lin et al., 2012) (les monocytes, les cellules dendritiques, les kératinocytes et les lymphocytes T).

Cependant l'induction de l'expression de MICA/B est parait possible par toute les cellules en conditions de stress (Kloss et al., 2008). En effet, une analyse comparative de taux d'expression de MICA/B dans divers types de cellules et de tissus sains ou pathologiques a permis la détection de transcrits MICA/B dans la plupart des échantillons testés à l'exception du système nerveux central (Molinero et al., 2004; Schrambach et al., 2007)(figure 43).



**Fig. 43 :** Régulation de la synthèse de MICA et MICB , du gène à la protéine.

En plus des mécanismes liés aux dommages de l'ADN, différents travaux ont montré que l'expression des protéines MICA et MICB peut également être modulée par les cytokines pro-inflammatoires qui assurent soit une régulation positive tel que le TNF $\alpha$  (Lin et al., 2012), L'interleukine-2, -4 et -15 (Molinero et al., 2006), ou une régulation négative tel que l'IFN $\gamma$  qui induit la diminution de l'expression de MICA et MICB sur des cellules tumorales (Zhang et al., 2005 ; Schwinn et al., 2009). Un nouveau mécanisme de régulation a été décrit basé sur l'utilisation des miARN (Stern-Ginossar et al., 2008) dont parmi eux ont été décrits à ce jour : miR-17-5p,

miR-20a, miR93, miR-520b, miR106b-5p, miR-372 et miR 373-3p. Tous ces miARN reconnaissent une séquence localisée dans la région 3'UTR des ARNm codant pour MICA ou MICB.

#### c- MICA/NKG2D : de la reconnaissance à la lyse de la cellule cible :

La fonction principale des NK consiste à l'élimination des cellules transformées (infectées ou tumorales). Avant cette étape critique et irréversible, les NK doivent passer différents points de contrôles afin de décider si la cellule contactée doit être éliminée ou non. Ce processus comprend trois étapes majeurs : la reconnaissance de la cellule cible, la phase effectrice et enfin l'étape correspondant à un retour à la normale du NK (**figure 45**).

##### **-La phase de reconnaissance du NK et de la cellule cible :**

Les cellules NK ont la capacité de sélectionner les cellules à éliminer grâce aux longs prolongements cytoplasmiques appelés nanotubes (**Chauveau et al., 2010**). Ces structures fines et non adhérentes permettent d'orienter les NK vers les cellules exprimant le plus de ligands de stress. De plus, la présence de nanotubes sur les NK a été associée avec une meilleure cytotoxicité, ce qui suggère que ces structures particulières sont capables de libérer des granules cytotoxiques. Une fois la cellule à éliminer est identifiée, les cellules NK s'adhèrent aux cellules transformées (**Bryceson et al., 2009**) d'où la formation d'une synapse immunologique. Cette synapse une fois activée va permettre le recrutement de tyrosines kinases, la production de PIP(4,5)P2 et la réorganisation de la F-actine tout en inhibant toutes voies de signalisations impliquées dans la migration des cellules NK (**Mace et al., 2010**).

##### **-La phase effectrice :**

Lors de la phase effectrice, les NK vont libérer massivement ses granules cytotoxiques et lyser la cellule cible (**Orange et al., 2002**). Suite à l'interaction entre le ligand et son récepteur activateur, MICA et NKG2D par exemple, plusieurs voies de signalisations sont activées tel que la voie de la PI3K, la voie de la phospholipase C $\gamma$  (**Bryceson et al., 2011**) et la voie de NF $\kappa$ B (**Lin et al., 2012**).

La phase effectrice se termine lorsque les granules arrivent au niveau de la synapse pour fusionner avec la membrane plasmique du NK et libérer la perforine et le granzyme B (**Pandey et al., 2007**). Lors de la phase effectrice, un phénomène particulier peut avoir lieu, il s'agit de la trogocytose (**Nakamura et al., 2013**).

##### **-La phase de terminaison :**

La phase de terminaison est marquée par le retour à l'état normal des NK activées. Durant cette phase la cellule cible est entrée en apoptose suite à l'intégration du granzymes B facilité par la perforine (**Simhadri et al., 2012**). La terminaison est alors initiée avec l'internalisation et la

dégradation des récepteurs NKG2D et CD16 ayant interagies avec leurs ligands, ce qui conduit à une baisse progressive du signal activateur (**Romee et al., 2013**). La phase de terminaison prend fin avec le détachement du NK de sa cible.

#### 4.2- Les protéines ULBP:

Les protéines ULBP sont codées par le gène ULBP localisé dans la région 6q24.2-25.3 du chromosome 6 (**Radosavljevic et al., 2002**). Dix gènes forment le locus ULBP et seulement 6 codent pour des protéines fonctionnelles, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5 et ULBP-6. Les gènes codant pour les protéines ULBP, en comparaison aux allèles MIC, sont très peu polymorphes. Les protéines ULBP-4 et -5 sont des glycoprotéines transmembranaires alors que les glycoprotéines ULBP-1, -3 et -6 sont ancrées à la membrane au moyen d'un groupement GPI (glycophosphatidylinositol). ULBP-2 a la particularité de pouvoir être exprimée à la membrane sous une forme transmembranaire ou ancrée à la membrane via un groupement GPI (**Fernandez-Messina et al., 2011**) ( **figure 44**).

Ligand humains	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	ULBP4	ULBP5	ULBP6
Structure domaines extra-cellulaires								
Ancrage à la membrane	TM+Cyt	TM+Cyt	GPI	GPI	GPI	TM+Cyt	TM+Cyt	GPI
Affinité pour NKG2D (Kd)	0.5µM	0.5µM	1,1 µM	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Ligand murins	H60	MULT1	Rae1ε	Rae1α	Rae1β	Rae1γ	Rae1δ
Structure domaines extra-cellulaires							
Ancrage à la membrane	TM+Cyt	TM+Cyt	GPI	GPI	GPI	TM+Cyt	TM+Cyt
Affinité pour NKG2D (Kd)	0,02µM	0,004µM	0,02µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM

**Fig. 44** : Structures et affinités des différents ligands de NKG2D.

#### 4.3- NKG2D et pathologies immunes :

De nombreuses études rapportent l'implication des ligands de stress dans diverses pathologies (**Diefenbach et al., 1999**) notamment dans le rejet de greffe, le développement de maladies auto-immunes (**Luo et al., 2014 ; Cerwenka et Lanier., 2003**) .

Il est relativement évident de mettre en relation le contexte tumoral et l'expression des ligands MICA/B et ULBP1 puisque ces molécules sont régulièrement exprimées à la surface des cellules

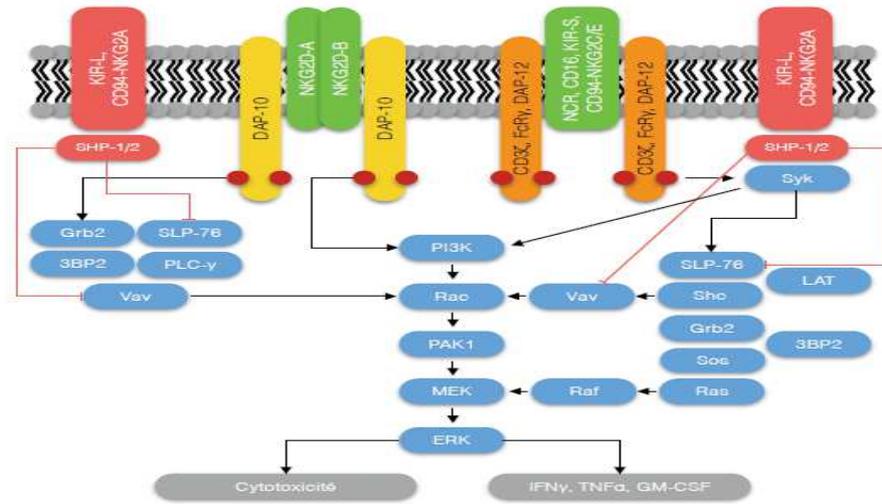
tumorales ce qui facilite leurs éliminations par les cellules NK (**Groh et al., 1999 ;Bauer et al., 1999**).

Ces résultats soutiennent l'idée que les NK participent activement à la reconnaissance et à l'élimination des tumeurs (**Cerwenka et al., 2001; Diefenbach et al., 2001**). De nouvelles études menées par Smyth avec des anticorps neutralisant le NKG2D et par Nadia Guerra avec des souris déficientes pour NKG2D montrent l'importance du récepteur dans la surveillance des cellules tumorales. En effet, ces deux études montrent que les souris ayant reçues des anticorps bloquants anti-NKG2D ou des souris déficientes pour NKG2D ont une susceptibilité accrue de développer une tumeur (**Smyth et al., 2005; Guerra et al., 2008**).

Certains types de tumeurs ont pu échapper au système immunitaire en ciblant les gènes codant pour des ligands du récepteur NKG2D. L'équipe de Beatriz Suarez-Alvarez a montré que plusieurs lignées cellulaires issues de leucémies myéloïdes aiguës peuvent moduler l'expression de MICA et des ULBP-1, -2 et -3. Cette étude démontre que la baisse d'expression de ces différents ligands est corrélée avec une forte méthylation du gène codant pour ces mêmes ligands (**Baragaño Raneros et al., 2015**).

#### 5- Voies de signalisations activées par NKG2D :

Le récepteur NKG2D est couplé à la membrane de façon non-covalente avec la protéine adaptatrice DAP10, premier élément de la signalisation induite par NKG2D (**Gilfillan et al., 2002**). Une étude a montré que les souris déficientes en DAP10 présentent un développement normal des NK mais la fonction cytotoxique passant par NKG2D est fortement diminuée sans être totalement abrogée. L'interaction entre NKG2D et l'un de ses ligands va phosphoryler DAP10 et permettre le recrutement des protéines de signalisation Grb-2, PLC-g2, SLP-76, PI3K et Vav-1 (**Billadeau et al., 2003**). L'ensemble de ces protéines de signalisation converge vers la protéine Rac, élément clé dans l'activation de la voie MAPK via l'activation en cascade des protéines Sos, Ras, Raf et MEK (**Colucci et al., 2001**) (**figure 45**).



**Fig. 45 :** Voies de signalisation impliquées dans l'activation des NK.

# **Objectifs de la thèse**

Depuis la découverte du premier transporteur ABCB1 en 1976, de nombreuses études ont porté sur le fonctionnement moléculaire des transporteurs ABC. Leur fonction en tant que transporteur de divers types de substances leur confère d'importants rôles dans l'absorption, la distribution, et l'excrétion des composés pharmacologiques. Ils se trouvent ainsi impliqués dans certaines maladies héréditaires et physiopathologiques graves. Mais leur implication dans l'apparition de phénotype MDR reste encore la fonction la plus importante à étudier.

La première partie de mon travail de thèse s'est articulé autour des 3 priorités suivantes:

- 1) Déterminer le taux d'expression des ABC dans divers types de lignées cellulaires tumorales *in vitro* et *in vivo* en présence ou non de dichloroacetate afin d'évaluer l'effet de cette molécule sur "la correction" de phénomène de la chimiorésistance.
- 2) Evaluer l'effet de dichloroacetate sur le mode d'action des transporteurs ABC en présence d'un agent cytotoxique utilisé dans le traitement de divers types de cancers (Daunorubicine).
- 3) Déterminer par quelle(s) voie(s) de signalisation(s) le dichloroacetate peut modifier l'expression des transporteurs.

Bien que la chimiorésistance représente un obstacle majeur devant la réussite des traitements qui visent à réduire ou à éliminer les cellules cancéreuses, et que les progrès visant à "corriger" la chimiorésistance peuvent former une révolution contre les cancers, elle reste une méthode limitée pour certains types de cancers.

Malgré les travaux de recherches excessives pour améliorer les résultats obtenus après administration des traitements anticancéreux, cependant des nouvelles thérapies sont recommandées. L'immunothérapie du cancer de sang est actuellement une voie thérapeutique en pleine expansion mais elle montre encore des limites et des effets secondaires prouvés.

Certaines équipes se sont intéressées à des nouvelles approches thérapeutiques qui font appel à l'utilisation des molécules qui ne présentent aucun effet négatif sur les cellules saines.

Le dichloroacetate est l'une des méthodes qui a prouvé son efficacité dans l'élimination de divers types de cancer.

Dans cette deuxième partie de thèse, nous avons d'abord s'intéresser à:

- 1) Associer l'immunothérapie basée sur l'utilisation des NK activées au dichloroacetate et vérifier leur efficacité contre les cancers du sang.
  
- 2) Déterminer l'effet de DCA sur l'expression des ligands de stress (MICA/B et ULBP1) exprimés sur la surface des cellules tumorales.
  
- 4) Evaluer l'effet de la modification de l'expression de ces ligands, suite à l'action de DCA, sur la cytotoxicité des cellules NK face aux cellules tumorales.

# **Matériels et Méthodes**

---

**I) MATERIELS :****1) Lignées cellulaires :**

Les lignées cellulaires utilisées :

- **HL-60**: fut obtenue à partir de cellules d'un patient atteint d'une leucémie aiguë myéloblastique de type 2 selon la classification FAB (French-American-British).

Les cellules HL-60 ont la caractéristique d'être bi-potentiellles, c'est à dire de se différencier soit vers la voie granulocytaire, soit vers la voie monocytaire, selon que l'ATRA ou la VD3 sont utilisées (**Breitman et al., 1980**).

- **K562** : fut obtenue à partir de cellules d'un patient atteint d'une leucémie chronique myéloïde.

- **NB4** : sont des cellules obtenue à partir de patient atteint de leucémie promyeloctaire aigue .

- **MOLM13**: lignée cellulaire leucémique humaine obtenue à partir de sang de patient atteint de leucémie monocytaire aigue en phase de rechute.

-**Les cellules Jurkat** : une lignée cellulaire immortalisée de lymphocyte T humain, a été établie vers la fin des années 1970 à partir du sang d'un garçon de 14 ans atteint d'une leucémie. Ces cellules sont beaucoup utilisées en science en raison de leur capacité à produire de l'interleukine 2. Toutefois, leur utilisation principale reste dans le domaine de la détermination des mécanismes de résistance aux traitements et aux radiations anticancéreux.

- **OCI-AML3**: lignées cellulaires leucémiques humaine obtenue à partir de sang de patient atteint de leucémie myéloïde aigue.

- **HuH7**: lignée de cellules cancéreuses du foie dont le gène p53 est constitutivement inactivé et le promoteur du gène p16INK4a est hyperméthylé (aboutissant à une faible expression de la protéine correspondante).

- **HepG2**: hépatocarcinome humain dérivée du tissu hépatique d'un mâle âgé de 15 ans américain et caucasien avec un carcinome hépatocellulaire bien différencié. Les cellules HepG2 sont classiquement utilisées comme modèle de cellules hépatiques. Grace à leur capacité de différenciation morphologique et fonctionnelle *in vitro* , elle sont largement utilisées pour étudier le trafic intracellulaire et la dynamique des protéines membranaires et lipidiques de la bile dans les hépatocytes humains *in vitro* .

## 2) Oligonucléotides :

**Choix des amorces**

Les amorces, résumées dans le **tableau 16**, ont été choisies à l'aide du site Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) en essayant d'obtenir une taille d'amplillons comprise entre 75 et 200 paires de base (pb) afin d'obtenir une amplification optimale. Nous avons aussi opté de concevoir quand cela était possible une des amorces chevauchant 2 exons consécutifs du gène cible pour s'assurer que seul l'ADN complémentaire soit amplifié. Les amorces ont été commandées chez Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

**Tableau 16: Liste des amorces utilisées.**

gène	Amorces sens	Amorces anti-sens	
<b>MICA</b>	GAACGGAAAGGACCTCAGGA	ATATTCCAGGGATAGAAGCCAGAA	
<b>MICB</b>	CTCGTGAGTCCAGGGATCTA	GCGTTTCTGCCTGTCATAGC	
<b>ULBP1</b>			
<b>HUMAN</b>	<b>ABCBI</b>	GGAGGCCAACATACATGCCT	AGGCTGTCTAACAAGGGCAC
	<b>ABCC1</b>	CCCGCTCTGGGACTGGAA	GTAGAAGGGGAAACAGGCC
	<b>ABCC5</b>	CTAGCTGGTCGTTTCACGGT	CCTCCTGCAGCCCCTACTATAC
	<b>ABCG2</b>	AGAGGATCCCACGCTGACT	CGAGGAAATGTCCCGAGTGA
	<b>Actine</b>	GAGGGAAATCGTGCGTGACA	AATAGTGATGACCTGGCCGT
<b>MOUSE</b>	<b>ABCBI</b>	TTCTCTTTGTCCGCGGAGTC	GAATGCTTCCAGGCATAAGCG
	<b>ABCC1</b>	CAAAGCCGGTGGAAAATGGG	GTGGGAAGACGAGTTGCTGA
	<b>ABCC5</b>	CTAGCTGGTCGTTTCACGGT	CCTCCTGCAGCCCCTACTATAC
	<b>ABCG2</b>	GTGGGAAGACGAGTTGCTGA	CCTCAGTTAATTTTCAGGACGACAG
	<b>Actine</b>	GAGGGAAATCGTGCGTGACA	AATAGTGATGACCTGGCCGT

---

## II) METHODES

### 1- Culture Cellulaire:

Les lignées cellulaires de leucémie myéloïde aigue LMA (MOLM13, NB4 et HL60) ont été cultivées en *Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640* contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF, décomplémenté par la chaleur (20 min. à 56°C) dans un environnement à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

Toutes les lignées cellulaires sont ensemencées à la concentration de  $3 \times 10^5$  cellules par ml et les cellules sont maintenues en phase exponentielle de croissance par une dilution, trois fois par semaines.

Les lignées cellulaires MOLM13 et OCI-AML1 sont des lignées ayant une p53 normal (wtp53), alors que la ligné NB4 exprime une protéine p53 mutée (mutp53) (au niveau R248Q) et la lignée HL60 ne présente pas de p53 (p53 nulle).

Pour les échantillons de la moelle osseuse et du sang sont obtenus à partir des patients ayant divers maladies hématologiques et des donneurs sains.

Les cellules sont purifiées après Ficoll-Histopaque (Sigma).

Les cellules primaires obtenues sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 medium contenant 10% SVF, 10ng/ml IL-6 .

### 2-Préparation des cellules primaires de patients et de donneurs sains, conditions de culture:

Les échantillons de patients atteints des maladies hématologiques ou des donneurs sains, sont obtenus après diagnostic dans le service d'hématologie du CHU Saint Eloi Montpellier (France) après consentement éclairé. Les cellules sont isolées par centrifugation sur un gradient de Ficoll-Histopaque à partir de la moelle osseuse ou du sang, cryopréservés en azote liquide (-180°C) dans de l'IMDM contenant 10% de DMSO et 50% de SVF ou bien directement utilisées pour des expériences d'immunologie. Les leucémies sont caractérisées selon des critères morphologiques (classification FAB).

Les progéniteurs hématopoïétiques normaux de phénotype CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> sont obtenus à partir de fragments résiduels d'os spongieux récupérés lors d'interventions chirurgicales dans le service d'orthopédie du CHU Saint Eloi Montpellier (France) après consentement éclairé. Les cellules sont ensuite sélectionnées positivement après élution sur une colonne «MACS CD34 Microbeads» contenant des billes magnétiques couplées à l'anticorps (Ac) CD34+(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Leur pureté est évaluée par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux CD45-FITC et CD34-PE (Beckman-Coulter, Inc), varie de 85 à 98%.

### 3- Prolifération, viabilité et apoptose:

Le test de la viabilité cellulaire, le comptage du nombre de cellules et le test apoptotique (AnnexinV assay) sont mesurés par l'appareil de Muse® Cell Analyzer (Millipore).

Dans certaines expériences les cellules sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 sans glucose supplémenté de 10 mM de galactose et de 4 mM de glutamine pour forcer les cellules à changer leur métabolisme vers la phosphorylation oxydative (OXPHOS)(Charni et al., 2009;Rathore et al., 2012).

L'analyse du cycle cellulaire est déterminé par le kit "Click-iT EdU flow cytometry assay " (Invitrogen, Molecular Probes).

La viabilité des cellules primaires est déterminée par le marqueur de fluorescent 7-AAD (7-amino-actinomycin D) (Beckman). Pour identifier les cellules tumorales divers anticorps spécifiques des marqueurs de surfaces ont été utilisés (Beckmann):

\* Anti-CD5-PB, -CD19-PE et -CD20-AlexaFluor750 pour les cellules des patients B-CLL,

\*anti-CD38-FITC et -CD138-APC pour le marquage des cellules des patients MM ,

\*anti-CD14-FITC, -CD33-APC et -CD34-PE pour le marquage des cellules des patients ayant une LMA,

\*anti-CD33-APC et CD34-PE pour les cellules de patient MDS ,

\*anti-CD10-APCAlexaFluor750, -CD19-PE ou -CD19-PE et -CD20-AlexaFluor750 pour le marquage des cellules du lymphome (BCL).

\* pour le marquage des lymphocytes T des donneurs sains un marquage avec l'anticorp-anti-CD3-APC est effectué.

Il suffit d'incuber  $1 \times 10^6$  de cellules avec les anticorps correspondants dans le PBS contenant 2,5% FBS pendant 20 à 30 minutes à 37°C, les cellules seront par la suite lavées et resuspendues dans un volume de 200-250  $\mu$ l de PBS riche en 2,5% de SVF .

L'analyse des cellules est ensuite effectuée en utilisant le Gallios™ flow cymomètre (Beckmann Coulter). Les résultats sont traités par le programme Kaluza.

### 4- Isolement des PBMC et purification des cellules NK:

Après élimination du plasma (centrifugation 1000 rpm pendant 15 minutes), le sang dilué avec au moins le même volume de RPMI 1640 seul (Glutamax (Invitrogen)) a été déposé sur du Ficoll-Paque plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) puis centrifugé à température ambiante à 1700 rpm pendant 30 minutes.

L'anneau contenant les cellules mononuclées a été récupéré et lavé (centrifugation 2000 rpm pendant 10 minutes) puis les cellules ont été comptées par le MUSE.

Les cellules NK ont alors été purifiées à l'aide du NK cell isolation kit® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) suivant les recommandations du fournisseur. La pureté a été évaluée par cytométrie en flux (FACScalibur®, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) et était supérieure ou égale à 95% (absence de contaminations en cellules CD3+, CD19+ et CD14+).

## **5- Dosage des protéines:**

### a- Principe

Le dosage des protéines est réalisé selon la technique BCA (Bicinchoninic acid protein assay kit, Sigma). La méthode BCA, plus tolérante que celle de Lowry ou de Bradford vis-à-vis de nombreux réactifs utilisés pour extraire les protéines, est compatible avec les détergents. Elle combine le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin et la capacité de l'acide bicinchoninique à former un complexe coloré avec les ions cuivreux. La structure macromoléculaire de la protéine, le nombre de liaisons peptidiques, et la présence de 4 acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine) sont responsables de la réduction des ions cuivriques  $Cu^{2+}$ . Le produit pourpre de la réaction est formé par l'interaction de 2 molécules de BCA avec un ion  $Cu^{2+}$ . Le complexe est hydrosoluble et présente une forte absorbance à 560 nm permettant ainsi le dosage colorimétrique des protéines (**figure 46**).

### b- Réalisation:

Une solution est préparée en mélangeant 50 parts de réactif A (BCA) et 1 part de réactif B (CUS04) en raison de 1ml pour chaque échantillon à doser. Ensuite on prépare des tubes eppendoffs contenant 1 ml de la solution (A+B) et on ajoute par la suite 100  $\mu$ l de la solution protéique à mesurer. Un chauffage au bain marie est ensuite effectué pendant 20 minutes à 60°C. Après incubation, un dosage colorimétrique sera effectué à 560 nm.

## **6- Technique de Western Blot:**

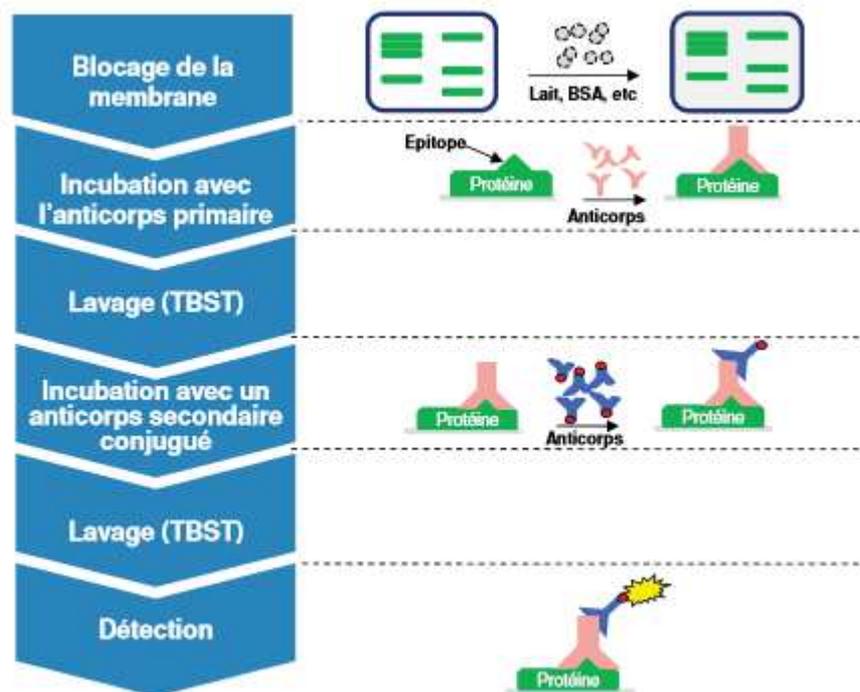
Des extraits protéiques totaux sont réalisés. Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X froid, le culot est repris dans 150  $\mu$ l de tampon Laemmli (SDS,  $\beta$ mercaptoéthanol et bleu de Bromophénol) puis chauffé pendant 5 minutes à 95-100°C.

Après cette dénaturation, les échantillons de protéines sont déposés sur un gel dénaturant d'acrylamide 12 %. La migration se fait à 80 V pendant 1 heure.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose ou PVDV (PolyVinylidène Fluoride) par électrotransfert à 100 V pendant 60 min en utilisant l'appareil Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) au froid. La solution de la saturation des membranes se fait selon la nature des anticorps à utiliser. Durant toute la nuit, la membrane est incubée à 4°C avec l'anticorps primaire dilué au 1/100<sup>e</sup> (dilution dépendante d'anticorps utilisés). Lavée 3 fois 10 min. avec du PBS 1X, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (diluée au 1/10000<sup>e</sup>) pendant 30 min.. Puis, 3 lavages sont effectués au PBS 1X contenant 0,05 % de Tween.

Enfin, la membrane est mise en présence d'une solution de détection (ECL, Amersham, Piscataway, NJ, EUA) durant une minute en utilisant la "chemiluminescence" (Millipore) ou "Supersignal West Dura extended duration substrate" (Pierce).

La détection Chimiluminescence est analysée par l'appareil "Molecular Imager Gel Doc XRS system (Bio-Rad)". La quantification des bandes est effectuée par le programme "Image lab" Bio-Rad).



**Fig.46:** Schéma représentatif des étapes de marquage de westernBlot.

---

## 7- Analyse de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel par RT-PCR:

### a- Principe :

L'étude de l'expression de gènes est réalisée par RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) semi-quantitative afin de détecter l'accumulation des ARNm, molécules issues de la transcription des gènes, précurseurs de la biosynthèse des protéines. Le principe de cette technique consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les "copier" *in vitro* en ADNc simple brin par l'action de la transcriptase inverse. Cette étape est fondamentale avant la réaction de polymérisation en chaîne qui fait intervenir une ADN polymérase. Les molécules d'ADNc obtenues servent alors de matrice pour cette réaction et un fragment de l'ADNc cible est multiplié en utilisant un couple d'amorces spécifiques correspondant à la séquence de l'ARN d'intérêt. Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus: (i) la dénaturation des deux brins d'ADN à 94°C pendant 45 sec, (ii) l'hybridation d' oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence cible d'ADN monocaténaire à une température d'hybridation spécifique ( $T_m$ ) pendant 45 sec, et (iii) la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase), à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale pendant 45 sec. Les fragments obtenus, après les cycles de PCR, sont alors suffisamment nombreux pour être visualisés sur gel d'agarose après électrophorèse.

### b- Réalisation :

#### ***Extraction de l'ARN***

L'extraction a été faite à l'aide du kit NucleoSpin RNA isolation columns (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. En résumé, les étapes suivies sont les suivantes:

- Lyse des cellules par ajout d'une solution de guanidine thiocyanate et 2-mercaptoéthanol afin de libérer l'ARN et d'inactiver les RNAses.
- Filtration du lysat sur colonne pour enlever les débris cellulaires et fragmenter l'ADN.
- Ajout d'éthanol 70% au lysat contenant l'ARN et transfert du mix lysat/éthanol dans une colonne de fixation ayant une grande affinité pour l'ARN total.
- Lavage par 3 ajouts de différentes solutions de lavage séparées par une étape de centrifugation.
- Éluion de l'ARN par ajout d'une solution d'éluion fournie.

La mesure de la concentration de l'ARN a été faite à l'aide d'un nanodrop spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). La qualité de l'ARN a été vérifiée sur Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Canada Inc. Mississauga, ON, Canada).

### ***Transcription inverse ou « RT »***

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNe) est réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux dénaturés à 70°C pendant 10 min, en utilisant des amorces poly-dT (0,5 µM, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) et 200 unités de MMLV Reverse Transcriptase (Eurobio, Les Ulis, France) dans un volume final de 20 µl de solution tamponnée fournie avec l'enzyme et complétée avec des dNTP (0,5 mM, Eurobio). Le mélange réactionnel est incubé 1h à 37°C, puis la réaction est stoppée en chauffant le mélange à 70°C pendant 15 min. Les solutions d'ADNc obtenues sont diluées (180µL volume finale) avant d'être stockées à -20°C.

## **8- La PCR quantitative :**

### a-Principe :

Une amplification PCR est composée principalement d'une phase exponentielle, d'une phase linéaire puis d'un plateau (**figure 47**).

La phase d'amplification exponentielle est celle pendant laquelle les réactifs ne sont pas limitant. Théoriquement, l'augmentation de la quantité de matrices à chaque cycle conduit à la formule mathématique suivante:

$$Q_n = Q_i (1 + \rho)^n$$

où  $Q_i$  est la quantité initiale de matrice,  $Q_n$  est la quantité de matrice obtenue au cycle  $n$  et  $\rho$  le rendement de la réaction PCR (ou efficacité). Si le rendement est de 100%,

$$\rho = 1 \text{ alors } Q_n = Q_i(2)^n$$

Il y a doublement de la quantité de l'ADN cible à chaque cycle. Théoriquement, il existe donc une relation quantitative, à un instant donné, entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité de produit amplifié.

Pour détecter les amplicons générés lors de la PCR quantitative, on utilise une «sonde» fluorescente dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR appelé le SYBR Green.

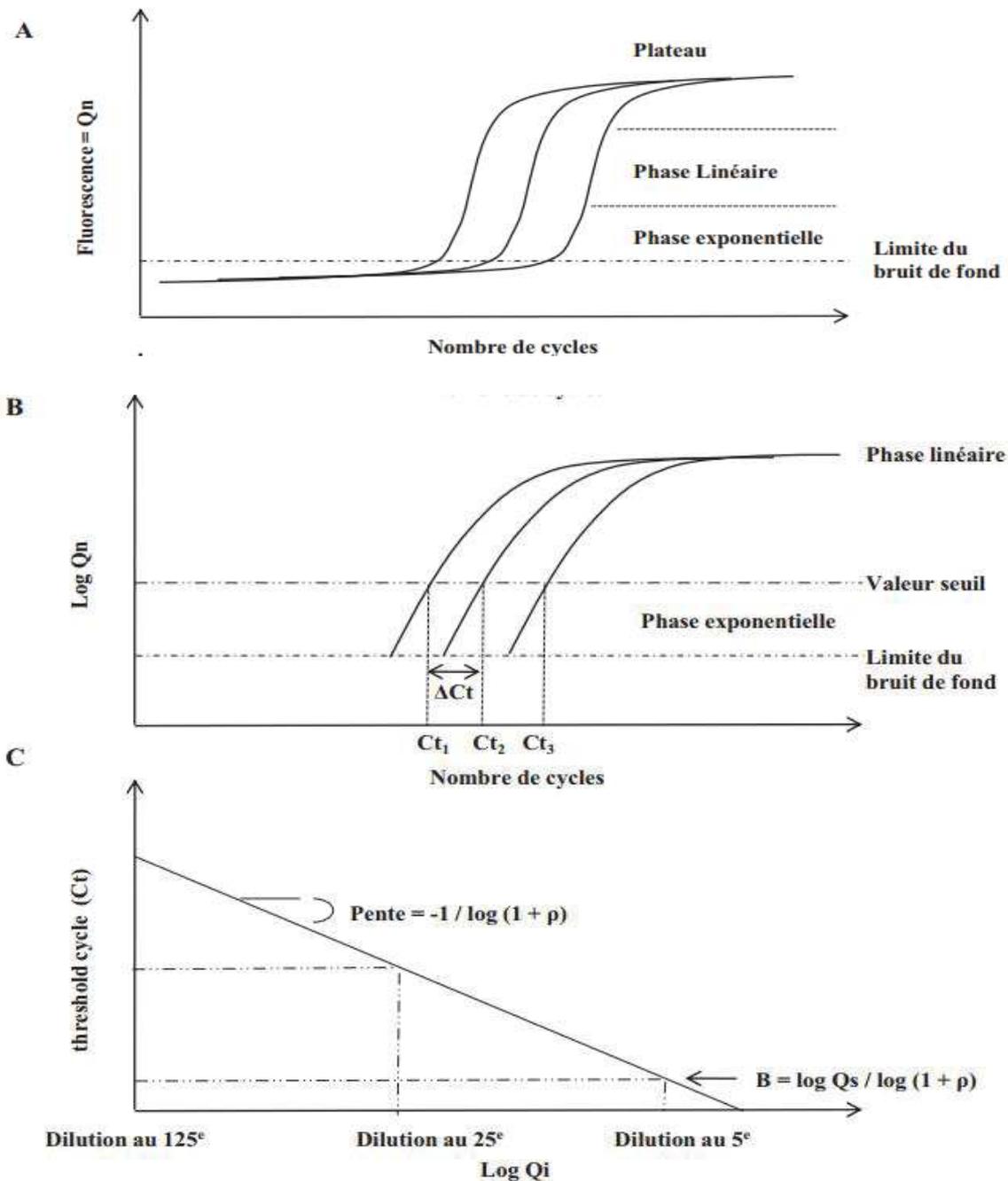
L'émission fluorescente du SYBR Green augmente lorsqu'il est intercalé à l'ADN double brin. Lorsque la PCR est suivie en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée en fin de chaque étape de polymérisation (**figure 47**)

Le SYBR Green I est un agent intercalant fluorescent qui ne se lie qu'à l'ADN double brin présent dans l'échantillon et qui n'inhibe pas la réaction d'amplification. Ainsi, durant l'amplification de l'ADNc par la polymérase, ce fluorochrome se lie aux amplicons à chaque cycle. Il en résulte une augmentation de la fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN produite. En effet, la réaction de PCR en temps réel est caractérisée par un point dans le temps où l'amplification de la cible est détectée pour la première fois. Cette valeur est appelée Ct, ou "cycle threshold". Le Ct représente donc le nombre de cycles n nécessaires pour atteindre une quantité de matrice (Qt) définie arbitrairement par le logiciel. Moins il y a de matrices au départ, plus le Ct sera élevé. Pour le calcul de la quantité initiale de matrice (Qi), il est essentiel de connaître le rendement (ou efficacité) de la PCR. L'efficacité de la PCR dépend des amorces et de la qualité des matrices.

Pour estimer l'efficacité de l'amplification, les échantillons sont dilués systématiquement (au 5ème, au 25ème, au 125 ème et au 625 ème dans notre cas). Et on détermine les Ct correspondant à chacune de ces dilutions. On reporte alors les mesures sur un graphique sur lequel les dilutions sont représentées selon une échelle logarithmique en base 10 (**figure 47**). On trace alors la droite de régression et on obtient l'efficacité par la formule suivante :  $\rho = 10^{-1/\text{pente}} - 1$ . Si l'efficacité est parfaite ( $\rho=1$ ), la pente vaut -3,32 ce qui signifie que chaque fois que le cycle seuil Ct baisse de 3,32, l'échantillon analysé contenait 10 fois plus de matrice.

Dans notre cas la PCR quantitative était utilisé pour déterminer les niveaux d'expression de nos gènes candidats. Donc il s'agit bien d'une RT-PCR (signifie Reverse Transcriptase PCR) soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc).

En réalité, il s'agit d'une PCR en temps réel réalisée sur un ADN complémentaire (ou ADNc), qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse.



**Fig 47.** Les différentes étapes aboutissant à l'analyse des données de la PCR en temps réel: Les courbes représentent des échantillons avec 3 dilutions différentes (au 5<sup>ème</sup>, au 25<sup>ème</sup> et au 125<sup>ème</sup> par exemple). A: graphique de sortie de la PCR en temps réel on reconnaît les trois phases classiques de la PCR (phase exponentielle, phase linéaire, plateau). La limite de détection et valeur seuil sont matérialisées. B: le graphique de sortie est présenté avec les valeurs logarithmiques C: obtention de la droite d'étalonnage grâce aux valeurs de  $Ct$  obtenues pour différentes dilutions, ce qui permet de calculer le rendement de la PCR.

**b- Protocole:**

Le mix LightCycler® 480 SYBR Green (Roche Diagnostics, USA) contient les dNTPs, la Taq polymérase et le SYBR Green. Le mélange réactionnel se fait dans un volume final de 10 µl. Il est composé de 4µl de mix, 3 µl de H<sub>2</sub>O, 1µl du couple d'amorces à 10 µM, 2 µl d'ADNc.

Les mélanges préparés sont placés sur des plaques PCR à 96 puits (Roche). L'appareil utilisé est le LightCycler 480 (Roche) (**figure 48**) et le logiciel utilisé est le LightCycler® 480 Software release 1.5.0 (Roche). Les étapes de PCR se déroulent comme suit :

\* Une première phase de dénaturation: 5min à 95°C pour dénaturer l'ADN et activer l'enzyme.

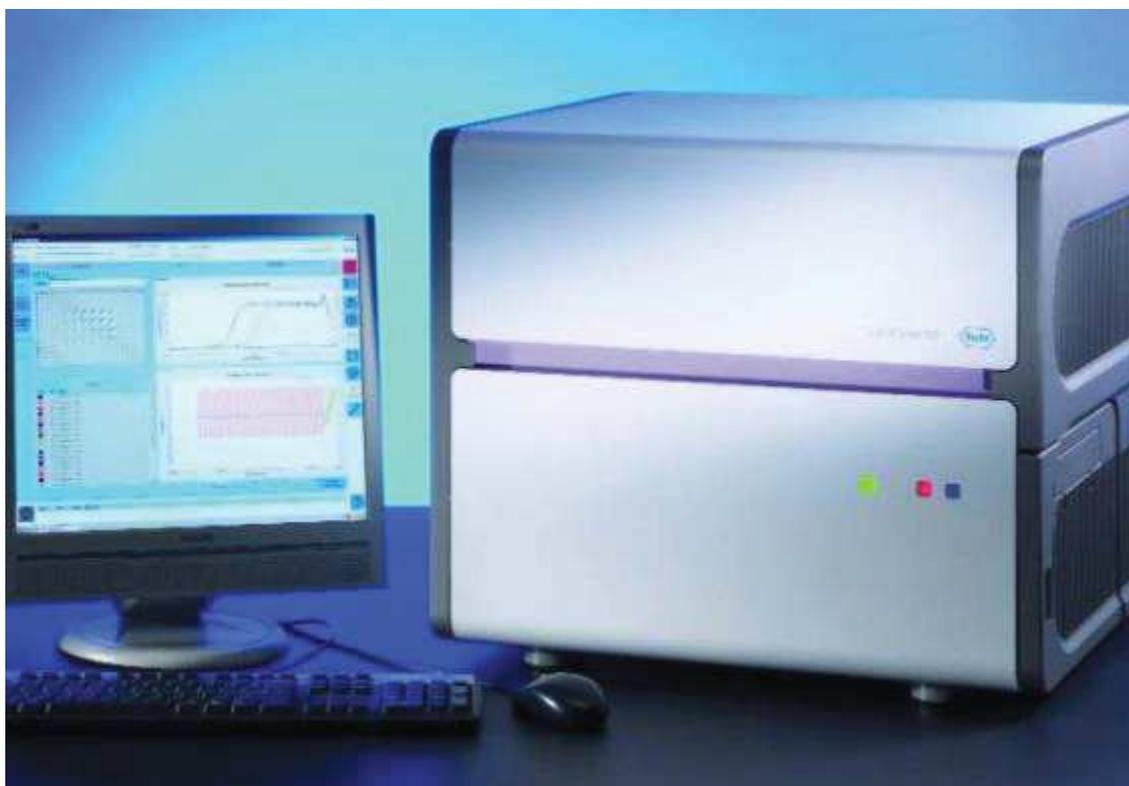
\* L'amplification se découpe en 45 cycles de trois phases chacun.

- Une phase de dénaturation à 95 °C qui dure 10s

- Une phase d'hybridation des amorces réalisée à 60 °C et qui dure 10s

- Une phase d'élongation à 72 °C pendant 10s

\* Mesure de la spécificité de l'amplification « melting curve » montée progressive de la température de 65 à 97 °C à raison de 0,11°C par seconde.



**Fig 48:** appareil LightCycler 480.

---

c- Dessin des amorces:

La réaction de PCR est réalisée en présence d'amorces spécifiques des séquences à amplifier. Ces amorces spécifiques ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). La contamination des échantillons par de l'ADN génomique étant l'une des principales difficultés de cette technique, les amorces doivent donc être choisies en tenant compte de la position des introns. Chaque couple d'amorce a été dessiné sur deux exons différents.

d- Spécificité des amorces:

L'étude de l'expression d'une famille de gènes par PCR quantitative pose le problème de discrimination des différents membres de la famille, dont les séquences sont parfois proches, par des couples d'amorces spécifiques de chaque gène. Certains membres de la famille des ABC Transporteurs peuvent avoir de fortes homologues de séquences nucléotidiques. La spécificité des amorces a donc été vérifiée sur le site BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Ce site permet d'effectuer des alignements de séquences entre nos amorces et l'ensemble des séquences humaines ou murines répertoriées. Chaque ADNc double-brin amplifié par PCR possède une température de fusion ( $T_m$ ) spécifique, définie comme étant la température pour laquelle 50 % de cet ADN double brin contenu dans l'échantillon en fin de réaction de polymérisation est sous forme double brin et 50 % est sous forme simple brin. Le  $T_m$  est déterminé par une étape dite de « fusion » réalisée après le dernier cycle de PCR : la température est élevée jusqu'à 95°C, à la vitesse de 20 °C/sec., afin de dénaturer l'ADNc double brin, puis elle est abaissée à la même vitesse jusqu'à une température supérieure de 10 °C à la température d'hybridation, et enfin augmentée très lentement (0,1 °C/sec.) jusqu'à 95°C. La fluorescence est lue en continu durant l'étape de fusion. Le  $T_m$  correspond au maxima de la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température. Cette étape permet de s'assurer qu'un seul pic est présent et donc qu'à priori la réaction d'amplification a été spécifique d'un seul ADNc. Une étape supplémentaire de refroidissement des produits d'amplification permet la réhybridation des ADNc simple brin et permet la vérification de l'identité du produit formé après amplification, à la suite de la migration des échantillons sur un gel d'agarose à 1,5 %. Une fois synthétisés, la spécificité de chaque couple d'amorces est vérifiée expérimentalement par l'observation d'une seule bande sur gel d'agarose, et l'obtention d'un pic unique après réalisation de la courbe de fusion des produits PCR. Pour certains gènes, nous avons du tester plusieurs sondes avant de trouver un couple d'amorces qui correspondait à ces critères. Lorsque l'on souhaite analyser l'expression de plusieurs gènes en même temps, il faut que les températures de fusion et que les temps d'élongation des couples d'amorces utilisées soient équivalents. Dans la mesure du possible, nous avons essayé de garder ces deux paramètres constants. Cependant, la spécificité de nos sondes étant le paramètre le plus important, nous avons

dessiné parfois des amplicons de plus grande taille et ayant de ce fait un temps d'élongation plus élevé.

### **9- Transport de Daunorubicine:**

L'accumulation intracellulaire de daunorubicine dans les cellules est mesurée à l'aide d'un cytomètre de flux Gallios (Bekman Clouter), équipé de 3 lasers et 10 photomultiplicateurs.

Le daunorubicine, un anticancéreux de la famille des anthracyclines issue de la fermentation de souches de *Streptomyces* utilisée en chimiothérapie le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques et des leucémies aiguës lymphoblastiques, a la capacité d'être fluorescent facilitant alors son trafic à travers la membrane des cellules.

On a incubé 500.000 cellules en phase exponentielle avec 5 $\mu$ M de daunorubicine dans une plaque de 48 puits, pendant 10, 30, 60, 120 minutes et 1 $\mu$ M pendant 24H.

Après incubation, on centrifuge les cellules 5 minutes à 1500 rpm suivie d'un lavage au PBS. Les cellules sont suspendues dans 3 ml de milieu RPMI 10% FBS pendant 30 minutes.

Les cellules sont par la suite analysés par le cytomètre de flux (Beckmann-Coulter, Elite), avec une excitation à 488 nm (argon laser). 10.000 cellules au minimum sont analysés pour chaque histogramme.

### **10- Evaluation de la toxicité des traitements:**

La toxicité des traitements est évaluée par le test au MTT qui repose sur une différence d'activité cellulaire entre des cellules saines et des cellules traitées. En effet, les cellules saines présentent une activité optimale des déshydrogénases mitochondriales, au contraire à des cellules ayant subi divers traitements toxiques. La réduction de sels de tétrazolium en cristaux de formazan représente un indicateur de la viabilité cellulaire. En ajoutant sur les cellules le substrat soluble jaune pâle MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5- diphényltétrazolium, Sigma), celui-ci pénètre à l'intérieur des cellules avant d'être converti, par les déshydrogénases présentes, en produit insoluble pourpre (cristaux de formazan), absorbant à 540 nm. Cette coloration pourpre est proportionnelle à l'activité des déshydrogénases mitochondriales et en conséquence à la viabilité cellulaire.

### **11- Les études *in vivo*:**

L'étude est réalisée chez des rats mâles NSG âgées de 6 à 8 semaines. Les animaux sont stabulés dans une salle thermorégulée ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) selon les normes de stréilité (Institut européenne de l'oncologie, la fondation italienne de la recherche de cancer (FIRC)(Milan,Italie) .Toutes les expériences et les soins sont conformes à la réglementation et aux normes éthiques en vigueur. Cette étude a été approuvée par le Comité Local d'Ethique de l'Expérimentation Animale.

---

**a- Traitement :**

Le traitement consiste à administrer 1 million de cellules AML par voie intraveineuse. Après 80 jours d'injection les souris NSG leucémiques sont traitées par DCA (50 mg/kg, 1 dose/jours par gavage, débuté de jour 1 au jour 16). Dans certaines études on a utilisé les souris B6 qui ont reçu une dose journalière de DCA (50 mg/kg/jour) par voie péritoniale. Les témoins négatifs de l'expérience n'ont reçu aucun traitement.

**b- Prélèvements:**

Après traitement, on prélève la moelle osseuse et la rate des souris NSG et pour les souris B6 une extraction de foie et de rate a été effectuée afin d'extraire l'ARNm.

**12- Statistiques:**

Toutes les expériences ont été réalisées au minimum en triplicata et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les comparaisons des moyennes entre les groupes non appariés ont été réalisées par le test t de Student après analyse de la variance. Le niveau de significativité a été choisi pour  $p < 0,05$ .

Le test-t de Student, publiée pour la première fois en 1908 par William Sealy Gosset qui travaillait chez Guinness (la brasserie de Dublin). Pour des raisons commerciales, il a dû utiliser le pseudonyme de Student, qui restera attaché à cette loi.

Il s'agit d'un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si les moyennes des deux groupes sont significativement différentes au point de vue statistique.

# Résultats

---

## Partie 1

### **Article1: Cell Metabolism Controls transcription of ABC Transporters Through ERK5 and Depending on p53 status**

#### **Résumé**

La chimiothérapie représente une voie standard des traitements antitumoraux. Les anthracyclines font parties des procédures de chimiothérapie le plus souvent indiquées.

Cependant, les cellules tumorales ont pu développer divers stratégies pour échapper non seulement au système immunitaire mais aussi aux agents anticancéreux d'où l'apparition de la *multidrug resistance* (MDR). Le phénotype MDR est "classiquement" lié aux protéines de transport membranaire de la famille des ABC qui présentent une affinité pour les anthracyclines.

Le changement métabolique quand à lui est une stratégie d'échappement des cellules tumorales qui favorise la fermentation lactique au lieu de la phosphorylation oxydatif. Parmi les molécules utilisées en essais clinique qui cible le métabolisme tumoral, le DCA qui a prouvé son efficacité dans l'induction de l'apoptose des cellules tumorales.

Le dichloroacetate est une molécule, utilisée habituellement en clinique pour traiter des troubles mitochondriaux. Elle agit par inhibition du pyruvate déshydrogénase kinase, ce qui favorise l'entrée de pyruvate dans le cycle de Krebs et donc l'arrivé de substrat au niveau de la mitochondrie.

Récemment Michelakis a mis en évidence que le DCA était capable de réduire la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*, notamment dans le gliome par l'activation des voies de l'apoptose d'ou la surexpression des protéines Bad, Puma, p53....

Un des mécanismes d'action possible du DCA pour la potentialisation de la mort cellulaire dans les cellules cancéreuses serait donc via l'augmentation de l'expression de protéine pro-apoptotiques, qui permettrait d'activer p53 et de ce fait d'initier l'apoptose.

Comprendre le mode d'action de DCA peut être une cible thérapeutique pour combattre le cancer. Cependant jusqu'au ce jour il reste encore mal connu.

Notre travail de recherche sera présenté en deux parties. La première partie comprend l'étude de l'effet de DCA sur l'expression et la traduction des transporteurs ABC (ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCG2).

---

La deuxième partie, l'étude de la distribution de la daunorubicine, une anthracycline de référence utilisée en cas de traitement de leucémie.

Ce travail a porté principalement sur la caractérisation *in vitro* de l'effet de DCA sur l'efflux de la daunorubicine et sa modulation dans le phénotype MDR.

---

**ARTICLE SOUMIS****Cell Metabolism Controls transcription of ABC Transporters Through ERK5 and Depending on p53 status**

Sana Belkahla<sup>1</sup>, Abrar Ul Haq Khan<sup>1, 2</sup>, Nerea Allende-Vega<sup>1, 2</sup>, Delphine Gitenay<sup>1,2</sup>, Catherine Alexia<sup>1, 2</sup>, Claire Gondeau<sup>1,2,3</sup>, Dang-Nghiem Vo<sup>1</sup>, Stefania Orecchioni<sup>4</sup>, Giovanna Talarico<sup>4</sup>, Francesco Bertolini<sup>4</sup>, Guillaume Cartron<sup>5</sup>, Javier Hernandez<sup>1</sup>, Martine Daujat-Chavanieu<sup>1,2</sup> and Martin Villalba<sup>1,2,6</sup>.

<sup>1</sup>IRMB, INSERM, Univ de Montpellier, Montpellier, France.

<sup>2</sup>Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapie (IRMB), CHU Montpellier, Montpellier, 34295, France.

<sup>3</sup>Département d'Hépatogastroentérologie A, Hôpital Saint Eloi, CHU Montpellier, France

<sup>4</sup>Laboratory of Hematology-Oncology, European Institute of Oncology, Milan, Italy

<sup>5</sup>Département d'Hématologie Clinique, CHU Montpellier, Université Montpellier I, 80 avenue Augustin Fliche, 34295 Montpellier, France.

<sup>6</sup>corresponding author

Keywords: ABC transporter, p53, ERK5, oxidative phosphorylation (OXPHOS), Dichloroacetate (DCA)

**Abstract**

Changes in metabolism require the efflux and influx of a diverse variety of metabolites. The ABC superfamily of transporters regulates the exchange of hundreds of substrates through the impermeable cell membrane. We show here that a metabolic switch to oxidative phosphorylation (OXPHOS), either by treating cells with dichloroacetate (DCA) or by changing the available substrates, reduced expression of ABCB1, ABCC1, ABCC5 and ABCG2 in wild-type p53-expressing cells. In contrast, OXPHOS increased the expression of the same transporters in mutated (mut) or null p53-expressing cells. This metabolic change induced histone changes associated to active promoters. Notably, DCA also inhibited expression of these genes in two animal models *in vivo*. ABC transporters control the export of drugs from cancer cells and render tumors resistant to chemotherapy, playing an important role in multiple drug resistance (MDR). Wtp53 cells forced to perform OXPHOS showed impaired drug clearance. In contrast mutp53 cells increased drug clearance when performing OXPHOS. Furthermore, OXPHOS induced expression of the MAPK ERK5. ABC transporter promoters contain binding sites for the transcription factors MEF2, NRF1 and NRF2 that are targets of ERK5. Decreasing ERK5 levels in wtp53 cells increased ABC expression whereas it inhibited expression in mutp53 cells. Our results showed that the ERK5/MEF2 pathway controlled ABC expression depending on p53 status.

## Introduction

The main purpose of cell metabolism is the conversion of metabolic substrates to energy (catabolism) or to build blocks for generating new molecules (anabolism). Metabolism requires the intake of substrates and the outtake of metabolites through the highly impermeable cell plasma membrane and multiple transporters with differences in specificity have been described. One of the biggest and better-conserved families of transporters is the ATP-binding cassette (ABC transporters; [1, 2]). The ABC superfamily has 48 members that have been classified into 7 groups (subfamilies A to G). One of their main biological functions is the transport of lipids [3], essential molecules for cell metabolism. Although it is conceivable that changes in metabolism regulate ABC expression, this remains uninvestigated.

ABC transporters are well known for their role in multiple drug resistance (MDR) because many of them export anticancer drugs and render tumors resistant to chemotherapy [4]. The tumor suppressor gene *p53* is an important regulator of metabolic homeostasis by promoting OXPHOS and inhibiting glycolysis [5]. It induces the expression of different metabolic genes, such as cytochrome c oxidase 2 (*SCO2*), glutaminase 2 (*GLS2*), *p53* up-regulated modulator of apoptosis (*PUMA*), glucose transporter 1 and 4 (*GLUT1* and *GLUT4*) and TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (*TIGAR*) [6, 7]. More than half of all human tumors harbor mutations in the *p53* gene. Most of these mutations abrogate its DNA binding and transactivation activity [8], but others can provide mutant *p53* (mutp53) with gain-of-function (GOF) activity that is dependent on its *de novo* ability to regulate directly or indirectly gene expression [9, 10]. Furthermore, certain *p53* mutants enhance drug resistance in liver cancer cells and B-CLL cells [11, 12].

Several *ABC* promoters contain consensus *p53* binding sequences [4]. The direct regulation of *ABC* promoters by *p53* is controversial and depends on the architecture of the promoter, the nature of *p53* (mutant or wild type), the presence of other *p53* family members and variations cell- and tissue-specific [4, 13]. We have observed that inducing OXPHOS in leukemic cells sensitizes wtp53-expressing cells to genotoxic drugs such as doxorubicin and vincristine [7]. In contrast, cells carrying mutp53 were more resistant to these anticancer drugs.

OXPHOS promotes the expression of the MAPK extracellular signal-regulated kinase-5 (ERK5), which regulates the choice of metabolic substrates in hematopoietic cells [14-19]. ERK5 induces activation of several members of the MEF2 family of transcription factors by different mechanisms. It mediates direct serine and threonine phosphorylation of MEF2A, C and D [20, 21]. It activates

---

MEF2A and D by direct interaction because ERK5 serves as a MEF2 coactivator through its signal-dependent direct association with the MEF2 MADS domain . The effect of activated ERK5 on MEF2A-dependent transcription requires ERK5 kinase activity. MEF2 mediates several ERK5 effects on metabolism, including NRF2 activation [15, 16]. This transcription factor and the related NRF1 are master regulators of metabolism that are coordinated with MEF2 family to induce expression of metabolic genes [24]. .The promoters, or very proximal regions, of several *ABC* genes, i.e. ABCB1, ABCB4, ABCB8, ABCB9, ABCB10, ABCB11, ABCC1, ABCC4, ABCC12 and ABCG1, have MEF2A binding sites that have been validated by ChIP (<http://genome.ucsc.edu/>). Most of these transporters also have NRF1 or NRF2 binding sites, i.e. ABCB8, ABCB9, ABCB10, ABCB11, ABCC1, ABCC3, ABCC5, ABCC4, ABCC10, ABCC12, ABCC13, ABCG1, which have also been validated by ChIP (<http://genome.ucsc.edu/>). Hence, we investigated here if metabolism, through ERK5, controls ABC expression and the role of p53 status.

## Results

### OXPHOS induced ABC transporters in AML cell lines

We induced OXPHOS either by inhibiting pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) with dichloroacetate (DCA; [7, 14, 16, 25-27]) or by incubating cells in the absence of glucose. When glucose is no longer available, cells use alternative energy substrates, such as glutamine (Gln). Gln oxidation, or glutaminolysis, generates ATP through OXPHOS [28, 29] and this pathway is functional in leukemic cells [15, 30]. We called OXPHOS medium a glucose-free medium supplemented with 10 mM galactose and 4 mM Gln [14, 15, 30]). OXPHOS induces expression of both wt and mutp53 depending on the cellular context [7]. We used DCA concentrations on the range of that found in plasma of DCA-treated patients [31, 32] and tested the effect on the expression of 4 ABC transporters, ABCB1, ABCC1, ABCC5 and ABCG2, involved in MDR, in 3 AML cell lines with different p53 status: OCI-AML3 cells express wt p53, HL60 are p53 null and NB4 are mutp53 [7]. DCA decreased by half the mRNA of the different ABC transporters on OCI-AML3 cells and this correlated with protein reduction in the 2 examined transporters (Fig. 1A). In contrast, in HL-60 and NB4 cells, DCA increased mRNA and protein expression (Fig. 1B and C). Additionally, we studied primary cells derived from a B-cell lymphoma (BCL) patient with wtp53 (Fig. 1D) and observed that DCA decreased *ABC* mRNA and protein expression. Moreover, OCI-AML3 cells growing in OXPHOS medium displayed reduced mRNA expression of the above-mentioned ABC transporters (Fig. 2A). To verify that OXPHOS was affecting transcription of these genes, we assessed histone modifications that have been linked to *ABCC1* promoter activation [11, 12] in OCI-AML3 cells. We found that DCA inhibited acetylation on H3 K27 on the *ABCC1* promoter (Fig. 2B). We conclude that DCA inhibited transcription of *ABC* transporters on wtp53 cells.

### OXPHOS induced ABC transporters in hepatic cells

The main detoxifying organ is liver. We tested DCA effect in 2 hepatic cell lines expressing wtp53 (HepG2-C3A) or mutp53 (HuH7). When wtp53 was present, DCA decreased *ABC* transporters mRNA and protein (Fig. 3A and C). In contrary, and similar to mutp53 leukemia cells, DCA increased *ABC* mRNA expression in HuH7 cells and also ABCC1 protein (Fig. 3B-C). Surprisingly, ABCB1 protein decreased after treatment suggesting alternative posttranscriptional regulation. Finally, we examined the effect of OXPHOS on ABC transporters expression in non-transformed

---

cells. Primary hepatocytes from non-cancer patients, which were obviously wtp53, showed the same pattern than cell lines expressing wtp53 (Fig. 3D).

### **DCA decreased mRNA of *ABC* transporters *in vivo***

We had observed that DCA increased doxorubicine efficacy *in vivo* on tumor cells expressing wtp53 [7]. We engrafted human wtp53 AML primary cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID)-interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain null (NSG) mice, as previously described [7, 16]. Mice with established tumors (day 80 post-graft) were treated daily with DCA. The treatment was not toxic and did not show any notable effect on mice survival [7]. Human tumor AML cells gather in mouse spleen and bone marrow, hence we isolated mRNA from these organs and used human-specific primers. We observed that DCA significantly reduced expression of *ABC* transporters mRNA (Fig. 4A).

Additionally, we assessed the effect of DCA in normal tissues of non-tumor bearing wt mice. A daily injection of DCA, for 1 and up to 3 days, also reduced mouse *ABC* transporters mRNA in liver and spleen (Fig. 4B). The effect largely increased with the number of doses received. Hence, DCA reduced *ABC* expression in multiple wtp53 cell populations *in vivo*. This could, at least partially, explain its effect on genotoxic drug treatment in wtp53 tumor cells *in vivo* [7].

### **OXPHOS modulated drug clearance from tumor cells depending on its p53 status**

A direct functional consequence of modulating *ABC* transporters expression in tumor cells could be changes in their responsiveness to chemotherapeutic drugs. To investigate if the changes in the expression of *ABC* transporters affect drug clearance, we incubated tumor cells with the genotoxic drug daunorubicin. Since it is a fluorescent compound, its intracellular accumulation can be easily monitored by FACs. In addition, it is used in the clinic to treat leukemia and lymphoma, which are at the origin of some cell lines that we have used in our study. Finally, like other anthracyclines, it is exported from cells by a broad range of transporters [33]. We used OCI-AML3 cells treated for one week with 1 mM and 5mM DCA or growing in OXPHOS medium. Then, cells were further incubated with daunorubicin and drug clearance was followed by FACs. We found that OXPHOS OCI-AML3 cells were impaired on decreasing drug levels (Fig. 5A and 5C). The effect was mainly observed at short time points, but it was still noticeable as much as 24 h after (Fig. 5A). Primary wtp53 tumor cells from a BCL patient also showed decreased daunorubicin export (BCL-P2; Fig. 5D). As expected, the outcome was opposite in cells with alterations in p53. In tumor cells not

---

expressing p53 (HL-60) or expressing mutp53 (NB4) DCA induced a faster drug clearance in agreement with an increase on ABC transporters (Fig. 5E). Furthermore, blocking expression of wtp53 in OCI-AML3 cells by treating them with a small interference RNA against p53 (sip53) prevented DCA-induced decreased daunorubicin clearing (Fig. 5B), whereas a control siRNA did not show any effect (data not shown). Therefore, changes in mRNA and/or protein expression of ABC transporters due to metabolic changes lead to alterations in drug clearance, which depended in p53 status.

### **ERK5 was essential for DCA-induced effects**

We further investigated the underlying mechanism of OXPHOS-induced ABC transporters expression. We focused on the role of the ERK5/MEF2 pathway, which is activated in cells performing OXPHOS and is essential for cells performing OXPHOS [14-16, 30]. Therefore, we could not reduced ERK5 levels in this condition. We speculated that decreasing ERK5 levels in non-treated cells would have the opposite effect than DCA treatment. Reducing expression of ERK5 with a small interference RNA for ERK5 (siERK5) decreased and increased ABC transporters mRNA in HuH7 and primary hepatocytes, respectively (Fig. 6A and B). This suggested that ERK5 effects, like those of DCA, depended on p53 status. To test this hypothesis, we used Jurkat cells that express very low levels of mutp53 [34]. DCA or OXPHOS medium induced a small increase in ABCB1 protein (supplemental Fig. 1) and consequently shERK5 decreased mRNA of multiple ABC transporters (Fig. 6C)., In agreement, the ERK5 inhibitor XMD8-92 also decreased basal ABCB1 protein expression (Fig. 6D). Finally, overexpression of ERK5 increased ABC mRNA expression (Fig. 6C).

## Discussion

ABC transporters have attracted great attention in recent years due to their role in MDR [4]. But, it should be kept in mind that their main physiological role in eukaryotes is possibly the transport of other substances out of the cell, e.g. lipid transport [3]. It is somehow intuitive that changes in metabolism regulate the transport of a variety of molecules. We show here that wtp53 cells, which comprise the vast majority of non-transformed cells, performing OXPHOS decrease expression of ABC transporters. During OXPHOS, cells use most of the carbon of metabolic substrates to produce energy and CO<sub>2</sub>. Then, they should avoid releasing metabolites to external media. In contrast, during glycolysis, cells generate a number of intermediate metabolites that can not accumulate and would need to be exported. We hypothesize that this is the physiological interest to increase expression of the exporter ABC transporters during high glycolysis. However, tumor cells take advantage of this fact to acquire MDR. Transformed cells present a metabolism more orientated to anaerobic glycolysis than their non-transformed counterparts, which mainly use respiration/OXPHOS. This should favor tumor MDR by increasing ABC transporters activity in wtp53 expressing cells. In fact, MDR1-dependent chemoresistant cells show an even more glycolytic metabolism than the sensitive counterparts [35, 36]. Interestingly, hypoxia or changes in glucose levels increase MDR1 expression by hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1; [37, 38]). This could partly explain the observation that hypoxic tumor cells are more chemoresistant [13]. These observations could be exploited in the clinic to prevent MDR. Since more glycolytic tumors show higher MDR, inducing a metabolic switch should decrease MDR, although as we prove here the p53 status should be taken into account.

High expression of ABC transporters is often observed in drug-naïve tumors compared with the tissue of origin and, as previously described, this correlates with a more glycolytic metabolism. Hence, constitutive MDR1 or MRP over expression is likely regulated in some cells by pathways involved in malignant transformation, e.g. metabolic changes [13]. Metabolic drugs such as DCA could revert tumor metabolism and decrease ABC transporters expression. However, DCA accumulates both wt and mutp53 protein [7]. If the last induces ABC expression as suggested in several cell lines by our results and in previous works [4, 13], DCA would finally increase MDR. HSP90 inhibitors, e.g. 17-AAG, degrade mutp53 by favoring its MDM2-mediated ubiquitination [39], and we have shown that DCA cooperates with 17-AAG to kill mutp53 tumor cells [7]. This could be a possibility to treat mutp53 tumors. In summary, it is very essential to know p53 status before treatment with metabolic drugs as we have previously shown [7].

---

ERK5 could use different ways to transcriptionally activate *ABC* promoters, e.g. p53, NF- $\kappa$ B, NRF2, HIF1 and MEF2 [13]. ERK5 inhibition induces p53 activation and increases sensitivity to 5-fluorouracil in colon cancer cells but the role of ABC was not investigated [40]. We propose that ERK5 activity by regulating metabolism affects p53 effect in *ABC* promoters.

Oxidative stress induces expression of ABC transporters, which is likely mediated by NRF2 [41, 42]. ERK5, through MEF2, generates an antioxidant response independently of de novo ROS generation through NRF2 activation [16]. Hence, by activating NRF2, ERK5 could modulate ABC expression.

HIF regulates ABC expression [37, 38] and ERK5 regulates in normoxia an array of genes regulated by HIF1 in hypoxia [43]. In fact, ERK5 by modulating metabolism regulates genes that are regulated by HIF. This could be the case of *ABC* genes. Indeed, NF- $\kappa$ B mediates ABC expression by direct binding to *ABC* promoters [13, 44] or by regulating intermediate mediators. In particular during changes in glucose levels, NF- $\kappa$ B activates HIF1 that targets ABC promoters [38]. Given the fact that ERK5 activates NF- $\kappa$ B [45], this could mediate the effect of metabolism on ABC expression.

As previously described, the promoters of several *ABC* genes studied here, i.e. ABCB1 and ABCC1, have MEF2A binding sites. MEF2 mediates a large part of the observed ERK5 effects on metabolism [15, 16]. Hence, this could also be the case of ABC transporters. The existence of multiple ERK5 targets mediating ABC expression makes it difficult to elucidate their individual relevance. The contribution of each factor could depend, as discussed for p53 [4, 13], on the architecture of the promoter, the level of expression of each target, the presence of other targets and variations cell- and tissue-specific.

ERK5 inhibition in mutp53 cells decreased ABC expression (our results) and should decrease MDR and favors chemotherapy as it has been shown [40], although the mechanism was not described. Our results show that metabolism targets multiple *ABC* promoters, depending on p53 status, which will have a clear effect on drug export. In this context, DCA overcomes resistance to paclitaxel in A549/taxol cells [46]; however, p53 status is unknown in this subline although the parental cell line, i.e. A549, is wtp53. Then DCA could decrease expression of ABC transporters in this study as we have observed here. However, Zhou et al proposed that ABCB1 expression did not change and expression of other ABC members was not analyzed [46]. Authors propose that citric acid accumulation induces apoptosis, but DCA and paclitaxel can also activate alternative pathways leading to cell death. In our case, we have shown that inducing OXPHOS in wtp53 cells cooperates with genotoxic drugs to eliminate tumor cells in vitro and in vivo [7].

---

An interesting clinical approach would be to treat patients whose tumors express wtp53 with DCA before standard chemotherapy. We have used here DCA concentrations similar to that used in patients [7, 31, 32]. These concentrations were effective to change ABC expression and then should sensitize tumor cells to chemotherapy as we have observed in mice [7].

In summary, the effects of metabolism on the transcription of ABC transporters clearly depend on p53 status. However, sensitization to chemotherapy by metabolic drugs does not depend only on ABC transcription because pro-apoptotic pathways are also activated that could lead to synergism between metabolic drugs and standard chemotherapy.

**Acknowledgements**

FACs analysis was performed at the platform Montpellier Rio Imaging (MRI). We are indebted to the staff of the INM animal facility (RAM) for animal care. The collection of clinical data and samples (HEMODIAG\_2020) at the CHRU Montpellier was supported by funding from Région Languedoc Roussillon. The authors thank Dimitris Xirodimas for providing cells and p53 siRNA constructs.

All our funders are public or charitable organizations. This work was supported by an AOI from the CHU Montpellier (N°221826) (GC and MV), a grant from Fondation de France (0057921) to MV and a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (DNV).

**Author Contributions Statement**

S.B. A.K, N.A-V, D.G., C.A., S.G, C.G, D-N.V, S.O, G. T, M. B and F. B perform experiments. F. B, G.C., J. H, M. D-C and M.V wrote the main manuscript text. All authors reviewed the manuscript.

**Additional Information**

Authors declare no competing financial interests.

## Materials and Methods

### Ethical statement

Experimental procedures were conducted according to the European guidelines for animal welfare (2010/63/EU). Protocols were approved by the Animal Care and Use Committee “Languedoc-Roussillon” (approval number: CEEA-LR-12163).

### Reagents and antibodies

DCA was from Santa Cruz Technologies. Galactose and glutamine were from GIBCO. Human anti-ABCB1, ABCC1 and IgG were from Miltenyi Biotec and 7AAD from Beckman. The ERK5 inhibitor XMD8-92 was from Selleck.

### Plasmids

The expression vectors for ERK5, the pSUPER expression vector for GFP alone or GFP plus shERK5 and the pSiren-retroQ-puro (BD Biosciences) retroviral vectors for shERK5 and control have been previously described [45]. p53 siRNA was ON-TARGETplus SMARTpools (mixture of 4 siRNA) from Dharmacon and has been previously used [7].

### In vivo mouse experiments

In vivo experiments were carried out using 6 to 8 weeks/old male NSG mice. Mice were bred and housed in pathogen-free conditions in the animal facility of the European Institute of Oncology–Italian Foundation for Cancer Research (FIRC), Institute of Molecular Oncology (Milan, Italy). For engraftment of human cells, 1 million AML cells were injected intravenously (i.v.) through the lateral tail vein in non-irradiated mice. NSG mice with established human AML tumors (day 80 post-graft) were treated with DCA (50 mg/kg, 1 dose/day by gavage, starting at day 1 for 16 consecutive days). Human tumor AML cells gather in mouse spleen and bone marrow, hence we isolated mRNA from these organs. We used human-specific primers to visualize expression of human *ABC* mRNA. In a different experiment B6 wt mice were treated in pathogen-free conditions

---

at the INM animal facility at Montpellier, France, with a daily single dose of DCA (50 mg/kg/day) intraperitoneally and mouse LDLR mRNA was analyzed in spleen and liver after different times.

### **Cell lines and culture conditions**

The leukemic human cell lines, HL-60, NB4, Jurkat TAg and OCI-AML3 were grown in RPMI 1640–Glutamax (GIBCO) supplemented with 5% (Jurkat) or 10% (OCI) FBS [15, 16]. Primary cells from a lymphoma B cell patient (BCL-P2) were grown in the same medium with 10% FBS. In certain experiments cells were grown in RPMI 1640 without glucose (GIBCO 11879) with the addition of 2 mM glutamine and 10 mM galactose (OXPHOS medium). The Jurkat TAg cells carry the SV40 large T Ag to facilitate cell transfection. The hepatic cell lines HepG2-C3A and HuH7 were grown in MEM and DMEM respectively supplemented with 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, penicillin and streptomycin. The HCT116 human colon cancer cells were cultured in low glucose (5 mM) DMEM medium supplemented with 10 % FBS. Cellular confluence during experiments was between 80-85%.

### **Human liver samples and preparation of PHHs cultures**

Liver samples were obtained from liver resections performed in adult patients for medical reasons (CRB-CHUM - Biological Resource Center of the Montpellier University Hospital, Dr Jeanne Ramos and Pr Sylvain Lehmann). The use of human specimens for scientific purposes was approved by the French National Ethics Committee. All methods were carried out in accordance with the approved guidelines and regulations of this committee. Written informed consent was obtained from each patient prior to surgery. Human hepatocytes isolation and culture were performed as described previously [47]. Briefly, after liver perfusion, hepatocytes were counted and cell viability was assessed by trypan blue exclusion test. A suspension of  $1 \times 10^6$  cells/mL per well was added in 12-well plates pre-coated with type I collagen (Beckton Dickinson) and cells were allowed to attach for 12h. Then, the supernatant containing dead cells and debris was carefully removed and replaced with 1 mL of serum-free long-term culture medium (Lanford medium, LNF). The number of confluent attached cells was estimated at  $\sim 1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>.

---

**Transient transfection**

Jurkat cells in logarithmic growth phase were transfected with the indicated amounts of plasmid by electroporation [45, 48]. In each experiment, cells were transfected with the same total amount of DNA by supplementing with empty vector. Cells were incubated for 10 min at RT with the DNA mix and electroporated using the Gene Pulser Xcell™ Electroporation system (Bio-Rad) at 260 mV, 960 mF in 400 µl of RPMI 1640. Expression of the different proteins was confirmed by western blot. The transfection efficiency in Jurkat TAg cells is between 60 and 80%. In HuH7 cells, transfection of 30–50 nM siRNAs was carried out using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) in Opti-MEM (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Primary hepatocytes were transfected twice, at day first and third post-seeding. Cells were harvested 48 to 96 h post-transfection. OCI-AML3 cells ( $2 \times 10^6$  in 100 µl) were transfected with 300nM p53 siRNA, or control siRNA by electroporation using Nucleofactor Electroporation system (Lonza). Cells were harvested 24 to 72 h post-transfection.

**Counting and determination of cell viability.**

Cell number, viability and cell death was analyzed with the Muse Cell Analyzer (Millipore) by incubating cells with Muse Count & Viability and Annexin V and Dead Cell kits respectively, following manufacturer's instructions.

**RT-PCR**

Total RNA was extracted using NucleoSpin RNA isolation columns (Macherey-Nagel). Reverse transcription was carried out using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad). Quantitative PCR was performed with KAPA SYBR Green qPCR SuperMix (Cliniscience) and a CFX Connect™ Real-Time qPCR machine (Biorad) with ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCG2 and actin primers. All samples were normalized to β-actin mRNA levels. Results are expressed relative to control values arbitrarily set at 100. The primers used were:

**Mouse primers:**

ABCB1: Forward: (5'-TTCTCTTTGTCCGCGGAGTC-3') Reverse: (5'-GAATGCTTCCAGGCATAAGCG-3'), ABCC5: Forward: (5'-CTAGCTGGTCGTTTTACGGT-3') Reverse: (5'-CCTCCTGCAGCCCACTATAC-3'), ABCC1: Forward: (5'-CAAAGCCGGTGGAAAATGGG-3') Reverse: (5'-GTGGGAAGACGAGTTGCTGA-3'), ABCG2: Forward: (5'-CTCCTTGCCAGATAAGAGGGG-3') Reverse: (5'-CCTCAGTTAATTTTCAGGACGACAG-3'), Actin: Forward: (5'-GCGGACTGTTAGTGAGCTGCG-3') Reverse: (5'-TGTTTGCTCCAACCAACTGCTGTC-3').

**Human primers:**

ABCB1: Forward: (5'-GGAGGCCAACATACATGCCT-3') Reverse: (5'-AGGCTGTCTAACAAAGGGCAC-3'), ABCC5: Forward: (5'-CTTGTTTTGCTGCAGGGCTC-3') Reverse: (5'-CACATCAGAATTCCTGCGCC-3'), ABCC1: Forward: (5'-CCCGCTCTGGGACTGGAA-3') Reverse: (5'-GTAGAAGGGGAAACAGGCC-3'), ABCG2: Forward: (5'-TGTGTTTATGATGGTCTGTTGGTC-3') Reverse: (5'-TGTTGCATTGAGTCCTGGGC-3'), Actin: Forward: (5'-GAGGGAAATCGTGCGTGACA-3') Reverse: (5'-AATAGTGATGACCTGGCCGT-3').

**Flow Cytometry**

Briefly,  $1 \times 10^6$  cells were stained with antibody in PBS with 2% FBS and incubated at 37°C for 30 min. Cells were then washed and suspended in 200–250  $\mu$ l PBS 2% FBS and staining was analyzed using a Gallios flow cytometer (Beckman) and the Kaluza software.

**ChIP experiment**

OCI-AML3 cells were treated with 10mM DCA for 72 h. Ten million cells were centrifuged (5min; 1200rpm) and the pellet was washed two times in 1X phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature and suspended in 10mL of 1X PBS. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) at room temperature for 5 min. Fixation was lysed in 1 ml of cell lysis buffer (5 mM PIPES, 85 mM KCl, 0.5% NP40, Na Butyrate 10mM + 2X protease inhibitor cocktail (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X), Thermofischer)) at 0°C for 10 min. Nuclei were recovered by centrifugation (10min, 5000rpm) at 4°C and lysed in 250 $\mu$ l nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% SDS, 10 mM EDTA, Na Butyrate 10mM + Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (3X)) at 4°C for at least 2 hours. 250 $\mu$ l of each sample were then sonicated 2 times for 5 min (30 s on/off) at 4°C using a Bioruptor (Diagenode). After sonication, absorbances at 280 nm (A280) of 1/100 diluted samples were measured and A280nm was adjusted to 0.133 with nuclei lysis buffer. One hundred microliter were used for ChIP experiments in a final volume of 1 ml. Samples were incubated under gentle agitation at 4°C overnight in the presence of 3 $\mu$ g of either a specific antibody or a negative control. Antibodies (anti-K27Ac Ab4729

(Abcam) and negative control IgG (Diagenode)) were previously bound to DYNA Beads Protein G Novex (Life Technology) according to the supplier's recommendations. Dynabeads-bound immunoprecipitates were sequentially washed once with a low salt buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% triton, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1mM Na Butyrate + Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (1X)), a high-salt buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% triton, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1mM Na Butyrate) and a LiCl-containing buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM LiCl, 1% NP40, 1% Na deoxycholate, 1 mM EDTA, 1mM Na Butyrate) and, then, twice with a TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, Tween 20 0.02%). Samples were then eluted in 250µL of elution buffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS), and DNA-protein complexes were incubated at 65°C for 5 hours to reverse crosslinks. Samples were then treated with 100mg/ml proteinase K and 100 mg/ml RNase A at 45°C for 2 hours to digest proteins and contaminating RNA. DNA was purified with an extraction kit (NucleoSpin Gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel) according to the manufacturer's recommendations and qPCR analysis was performed using the Roche LightCycler 480 real-time PCR system. The data were normalized with inputs taken from samples before the immunoprecipitation and treated under the same conditions. The primers used to amplify various regions of LDLR gene promoter.

### **Daunorubicin accumulation / Drug Uptake Studies**

The intracellular daunorubicin accumulation in cells was examined by flow cytometer [49]. The logarithmically growing cells were cultured in 48-well plates and preincubated with or without 5 µM daunorubicin for different times (10', 30', 60', 120' minutes) and 1 µM for 24 h). After incubation, cells were placed on ice, washed twice with PBS and analyzed by flow cytometry (Beckman-coulter, Elite), excitation 488 nm (argon laser) for the mean fluorescence intensity (MFI) of intracellular daunorubicin. A minimum of 10000 events was analyzed for each histogram.

### **Statistical analysis**

The statistical analysis of the difference between means of paired samples was performed using the paired t test. The results are given as the confidence interval (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$ ). All the experiments described in the figures with a quantitative analysis have been performed at least three times in duplicate. Other experiments were performed three times with similar results.

---

## References

1. Jones PM and George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(6):682-699.
2. Ponte-Sucre A. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Applied microbiology and biotechnology.* 2007; 76(2):279-286.
3. Neumann J, Rose-Sperling D and Hellmich UA. Diverse relations between ABC transporters and lipids: An overview. *Biochim Biophys Acta.* 2017; 1859(4):605-618.
4. Bush JA and Li G. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *Int J Cancer.* 2002; 98(3):323-330.
5. Gottlieb E and Vousden KH. p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010; 2(4):a001040.
6. Puzio-Kuter AM. The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes & cancer.* 2011; 2(4):385-391.
7. Allende-Vega N, Krzywinska E, Orecchioni S, Lopez-Royuela N, Reggiani F, Talarico G, Rossi JF, Rossignol R, Hicheri Y, Cartron G, Bertolini F and Villalba M. The presence of wild type p53 in hematological cancers improves the efficacy of combinational therapy targeting metabolism. *Oncotarget.* 2015; 6:19228-19245.
8. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991; 253(5015):49-53.
9. Muller PA and Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol.* 2013; 15(1):2-8.
10. Muller PA and Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell.* 2014; 25(3):304-317.
11. Chan KT and Lung ML. Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 53(6):519-526.
12. Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Guner D, Dorken B and Daniel PT. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ.* 2003; 10(4):477-484.
13. Scotto KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene.* 2003; 22(47):7496-7511.
14. Charni S, de Bettignies G, Rathore MG, Aguilo JI, van den Elsen PJ, Haouzi D, Hipskind RA, Enriquez JA, Sanchez-Beato M, Pardo J, Anel A and Villalba M. Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway. *J Immunol.* 2010; 185(6):3498-3503.

- 
15. Lopez-Royuela N, Rathore MG, Allende-Vega N, Annicotte JS, Fajas L, Ramachandran B, Gulick T and Villalba M. Extracellular-signal-regulated kinase 5 modulates the antioxidant response by transcriptionally controlling Sirtuin 1 expression in leukemic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 53:253-261.
  16. Khan AU, Rathore MG, Allende-Vega N, Vo DN, Belkhala S, Orecchioni S, Talarico G, Bertolini F, Cartron G, Lecellier CH and Villalba M. Human Leukemic Cells performing Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) Generate an Antioxidant Response Independently of Reactive Oxygen species (ROS) Production. *EBioMedicine.* 2016; 3:43-53.
  17. Villalba M, Rathore MG, Lopez-Royuela N, Krzywinska E, Garaude J and Allende-Vega N. From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(1):106-113.
  18. Villalba M, Lopez-Royuela N, Krzywinska E, Rathore MG, Hipskind RA, Haouas H and Allende-Vega N. Chemical metabolic inhibitors for the treatment of blood-borne cancers. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 2014; 14(2):223-232.
  19. Catalán E, Charni S, Aguiló JI, Enríquez JA, Naval J, Pardo J, Anel A and Villalba M. MHC-I modulation due to metabolic changes regulates tumor sensitivity to CTL and NK cells. *Oncoimmunology.* 2015; 4(1).
  20. Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ and Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO Journal.* 1997; 16(23):7054-7066.
  21. Kato Y, Zhao M, Morikawa A, Sugiyama T, Chakravorty D, Koide N, Yoshida T, Tapping RI, Yang Y, Yokochi T and Lee JD. Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *Journal of Biological Chemistry.* 2000; 275(24):18534-18540.
  22. Kasler HG, Victoria J, Duramad O and Winoto A. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(22):8382-8389.
  23. Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF and Prody CA. Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26(20):4771-4777.
  24. Ramachandran B, Yu G and Gulick T. Nuclear respiratory factor 1 controls myocyte enhancer factor 2A transcription to provide a mechanism for coordinate expression of respiratory chain subunits. *J Biol Chem.* 2008; 283(18):11935-11946.
  25. Stacpoole PW and Greene YJ. Dichloroacetate. *Diabetes care.* 1992; 15(6):785-791.
  26. Stacpoole PW. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism: clinical and experimental.* 1989; 38(11):1124-1144.
  27. Michelakis ED, Webster L and Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2008; 99(7):989-994.
-

- 
28. Reitzer LJ, Wice BM and Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979; 254(8):2669-2676.
29. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ and Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64(3):985-993.
30. Rathore MG, Saumet A, Rossi JF, de Bettignies C, Tempe D, Lecellier CH and Villalba M. The NF-kappaB member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(9):1448-1456.
31. Stacpoole PW, Kurtz TL, Han Z and Langae T. Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(13-14):1478-1487.
32. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, Maguire C, Gammer TL, Mackey JR, Fulton D, Abdulkarim B, McMurtry MS and Petruk KC. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010; 2(31):31ra34.
33. Zhou Y, Wang R, Chen B, Sun D, Hu Y and Xu P. Daunorubicin and gambogic acid coloaded cysteamine-CdTe quantum dots minimizing the multidrug resistance of lymphoma in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine.* 2016; 11:5429-5442.
34. Cheng J and Haas M. Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(10):5502-5509.
35. Broxterman HJ, Pinedo HM, Kuiper CM, Schuurhuis GJ and Lankelma J. Glycolysis in P-glycoprotein-overexpressing human tumor cell lines. Effects of resistance-modifying agents. *FEBS Lett.* 1989; 247(2):405-410.
36. Staubert C, Bhuiyan H, Lindahl A, Broom OJ, Zhu Y, Islam S, Linnarsson S, Lehtio J and Nordstrom A. Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: a metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine. *J Biol Chem.* 2015; 290(13):8348-8359.
37. Chen J, Ding Z, Peng Y, Pan F, Li J, Zou L, Zhang Y and Liang H. HIF-1alpha inhibition reverses multidrug resistance in colon cancer cells via downregulation of MDR1/P-glycoprotein. *PLoS One.* 2014; 9(6):e98882.
38. Seebacher NA, Richardson DR and Jansson PJ. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics. *British journal of pharmacology.* 2015; 172(10):2557-2572.
39. Li D, Marchenko ND, Schulz R, Fischer V, Velasco-Hernandez T, Talos F and Moll UM. Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2011; 9(5):577-588.
40. Pereira DM, Simoes AE, Gomes SE, Castro RE, Carvalho T, Rodrigues CM and Borralho PM. MEK5/ERK5 signaling inhibition increases colon cancer cell sensitivity to 5-fluorouracil through a p53-dependent mechanism. *Oncotarget.* 2016; 7(23):34322-34340.
41. Ji L, Li H, Gao P, Shang G, Zhang DD, Zhang N and Jiang T. Nrf2 pathway regulates multidrug-resistance-associated protein 1 in small cell lung cancer. *PLoS One.* 2013; 8(5):e63404.
-

- 
42. Wang X, Campos CR, Peart JC, Smith LK, Boni JL, Cannon RE and Miller DS. Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers. *J Neurosci*. 2014; 34(25):8585-8593.
43. Schweppe RE, Cheung TH and Ahn NG. Global gene expression analysis of ERK5 and ERK1/2 signaling reveals a role for HIF-1 in ERK5-mediated responses. *J Biol Chem*. 2006; 281(30):20993-21003.
44. Breier A, Gibalova L, Seres M, Barancik M and Sulova Z. New insight into p-glycoprotein as a drug target. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2013; 13(1):159-170.
45. Garaude J, Cherni S, Kaminski S, Delepine E, Chable-Bessia C, Benkirane M, Borges J, Pandiella A, Iniguez MA, Fresno M, Hipskind RA and Villalba M. ERK5 activates NF-kappaB in leukemic T cells and is essential for their growth in vivo. *J Immunol*. 2006; 177(11):7607-7617.
46. Zhou X, Chen R, Yu Z, Li R, Li J, Zhao X, Song S, Liu J and Huang G. Dichloroacetate restores drug sensitivity in paclitaxel-resistant cells by inducing citric acid accumulation. *Mol Cancer*. 2015; 14:63.
47. Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin JC and Maurel P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol*. 2006; 320:283-293.
48. Garaude J, Farras R, Bossis G, Charni S, Piechaczyk M, Hipskind RA and Villalba M. SUMOylation regulates the transcriptional activity of JunB in T lymphocytes. *J Immunol*. 2008; 180(9):5983-5990.
49. Venne A, Li S, Mandeville R, Kabanov A and Alakhov V. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res*. 1996; 56(16):3626-3629.

## Figure legends

**Figure 1. DCA-induced ABC transporters expression depended on p53 status in leukemic cells.** Different hematopoietic cell lines OCI-AML-3 wtp53 (A), HL-60 nullp53 (B), NB4 mutp53 (C) and primary cells BCL-P2 wtp53 (D) were treated with 1 and 5 mM DCA for 1 week and RNA and plasma protein levels were analyzed by qPCR or FACs respectively. Data represent the % of mRNA compared to control cells. The bar graphs represent means  $\pm$  SD of 3 independent experiments performed in triplicate; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$  student t-test compare to control cells.

**Figure 2. OXPPOS inhibited ABC expression in wtp53 cells.** OCI-AML3 cells were grown in OXPPOS medium for 2 weeks and expression of ABC transporters was analyzed as in Fig. 1. The bar graphs represent means  $\pm$  SD of 3 independent experiments performed in triplicate; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$  student t-test compare to control cells. B) Cells were treated with 5 mM DCA for 3 days and processed for ChIP analysis. The enrichment of K27 acetylation on Histone 3 in the *ABCC1* promoter was analyzed as described in material and methods by using different primers around TSS.

**Figure 3. DCA-induced ABC transporters expression depended on p53 status in hepatic cells.** A-B) Hepatic cell lines HepG2-C3A wtp53 and HuH7 mutp53 were treated with 20mM DCA for 24h before analyzing mRNA level as described in Fig. 1. C) Cells were treated with the indicated concentration of DCA for 1 week and protein level was analyzed by FACs. D) Primary hepatocytes were treated with indicated amount of DCA for 72 hours. The data represent means  $\pm$  SD (n=3); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  Student's t-test compared to control cells or as depicted in the graphic.

**Figure 4. DCA induced ABC transcription in vivo.** A) NSG mice were engrafted with primary human AML cells. At day 80 post-graft, they were treated with DCA (n=4) or leave untreated (n=4). At day 140, mRNA from spleen or bone marrow was isolated and human ABCB1, ABCC1, ABCC5 and ABCG2 mRNA expression was quantified by qPCR. B) B6 wt mice (n=4/5 per group) were treated with a dose of DCA (50 mg/kg) everyday intraperitoneally and mice mRNA in spleen and liver at different times was obtained to analyze *ABC* transporters. The data represent means  $\pm$  SD; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  student t-test compare to non treated cells or mice.

---

**Figure 5. Metabolism-controlled drug outtake depended on p53 status.** A) Different cells were treated with 5 mM DCA for 7 days or incubated in OXPPOS medium for 14 days. Cells were then incubated with 5 uM daunorubicin clearance was measured at various time points (10, 30, 60, 120 minutes). Some cells were incubated with 1uM daunorubicin for 24H. Some cells were also transfected with a sip53 before analyzing drug exclusion (B). Experiments were repeated at least three times.

**Fig 6. The ERK5 pathway regulated ABC transcription.** A) HuH7 cells were transfected with control siRNA or siERK5. Thirty-six hours later mRNA expression was analyzed by qPCR. B) Primary human hepatocytes were transfected with control siRNA or siERK5 at day 1 and 3 post seeding. 96h later mRNA levels were assessed. C) Jurkat cells were transfected with a small hairpin RNA for ERK5 (shERK5) or ERK5 expression vector. 36h later mRNA expression was analyzed by qPCR. D) Jurkat cells were treated with 10  $\mu$ M XMD8-92 for 24 h before analyzing expression of ABCB1 by FACs. The data represent means  $\pm$  SD n=3; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 Student's t-test compared to empty vector transfected cells (control).

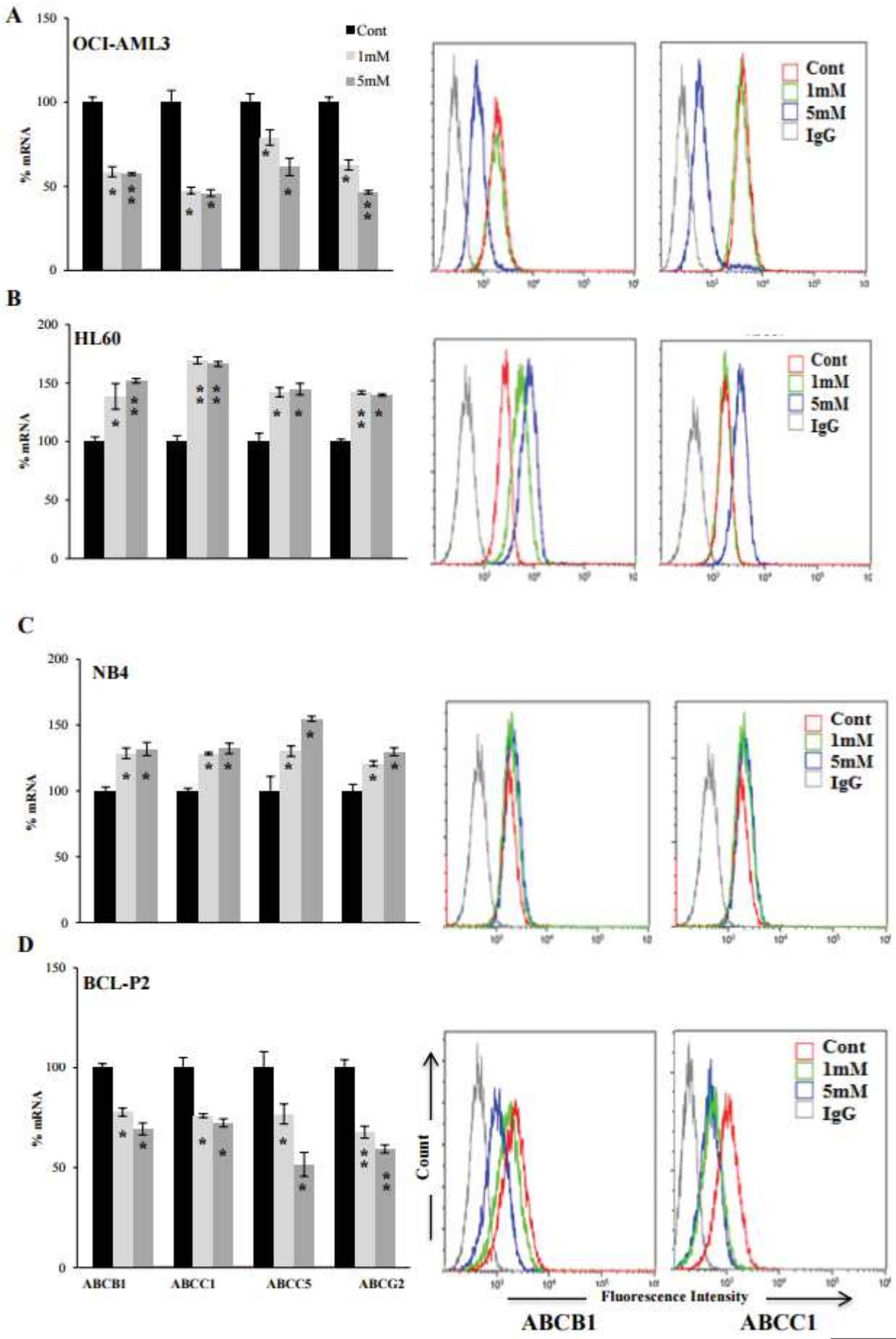


Fig.1

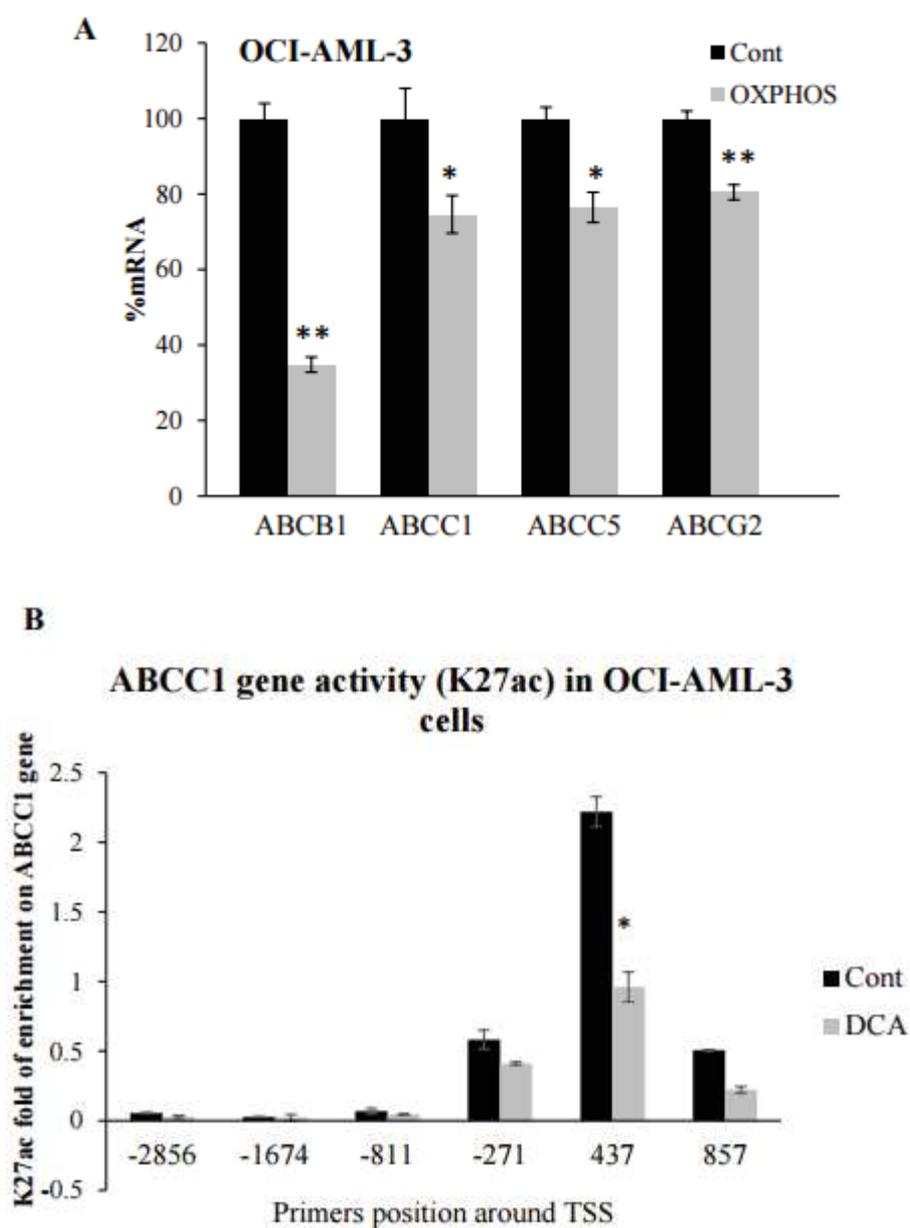


Fig.2

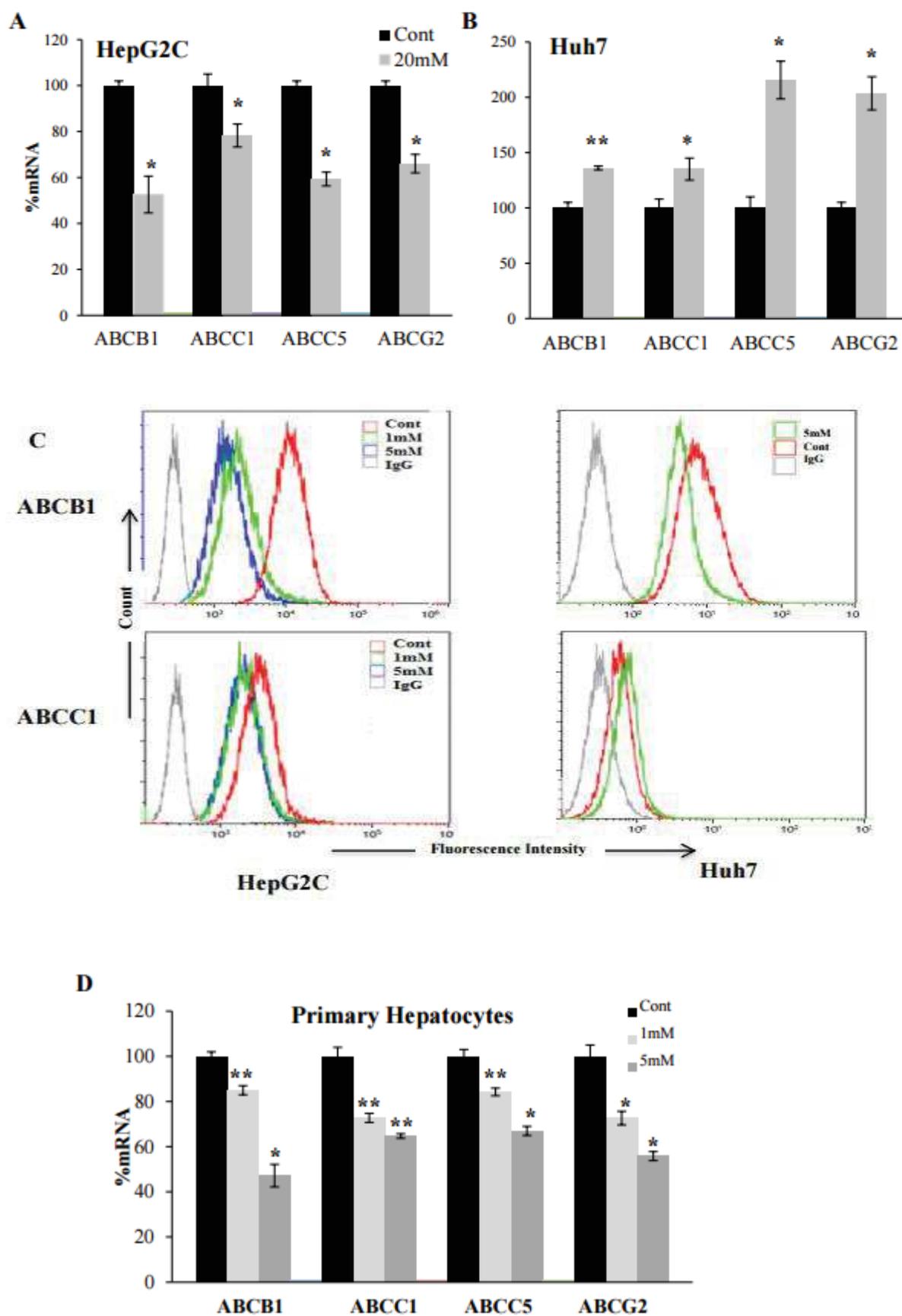


Fig.3

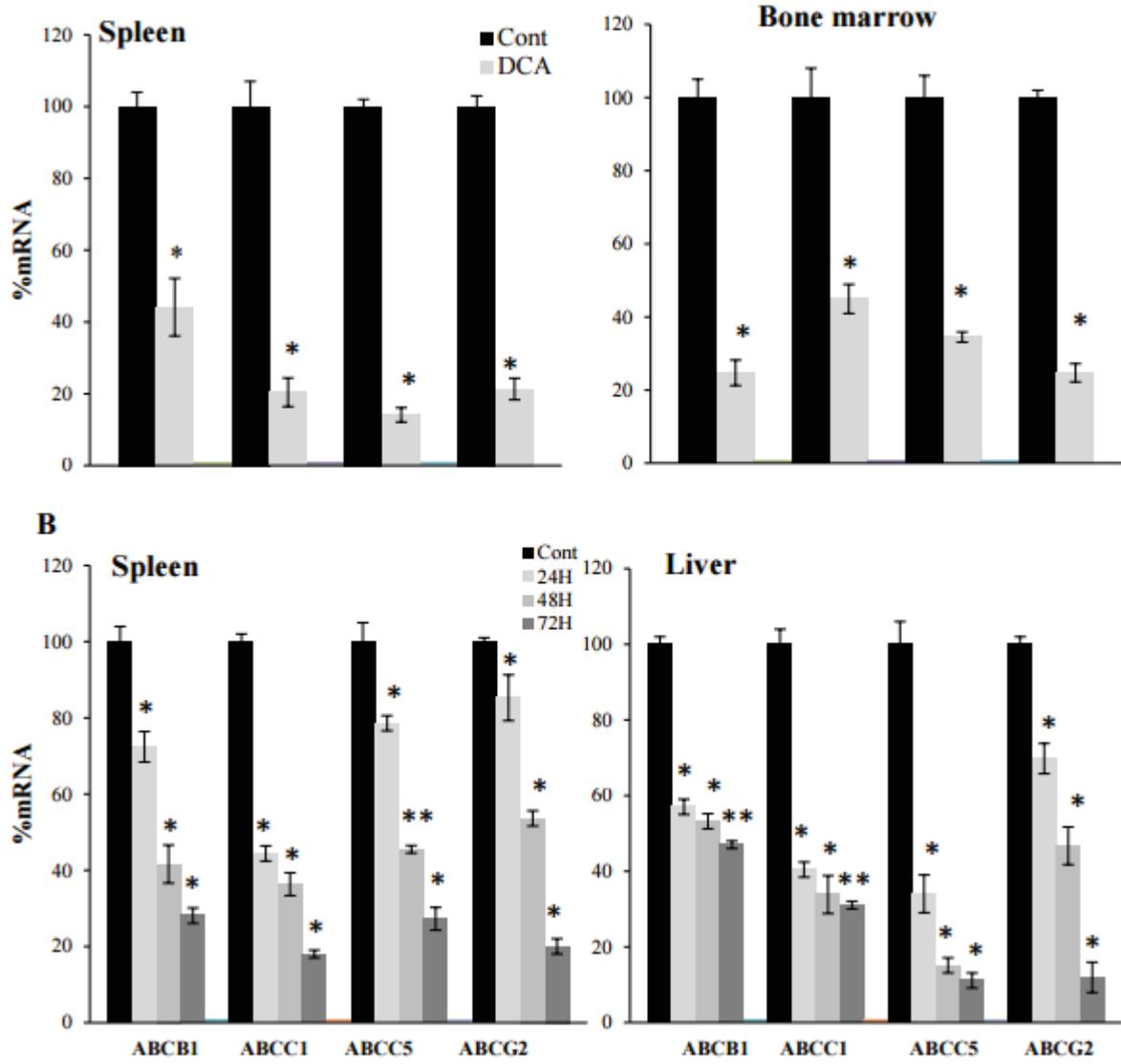


Fig.4

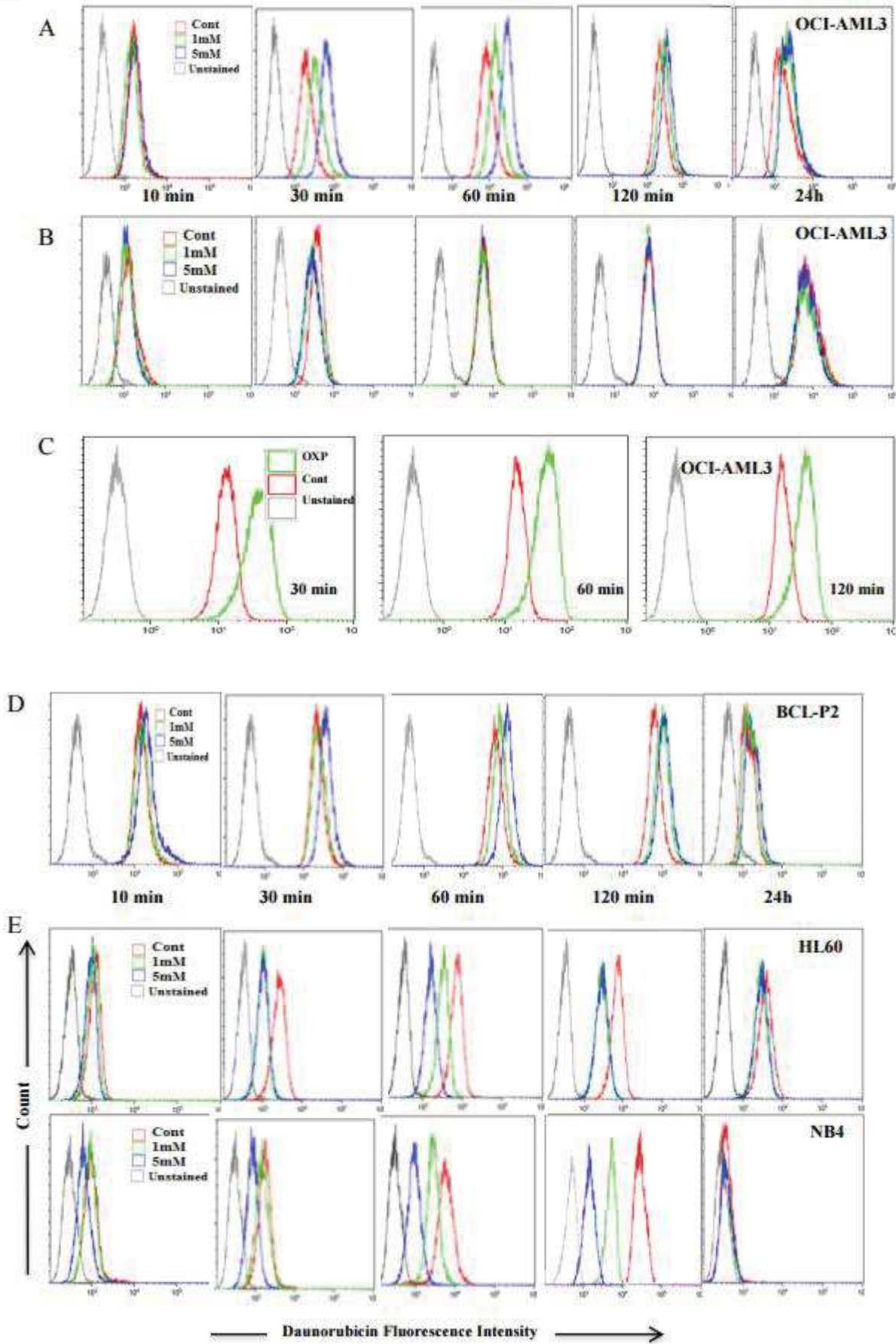
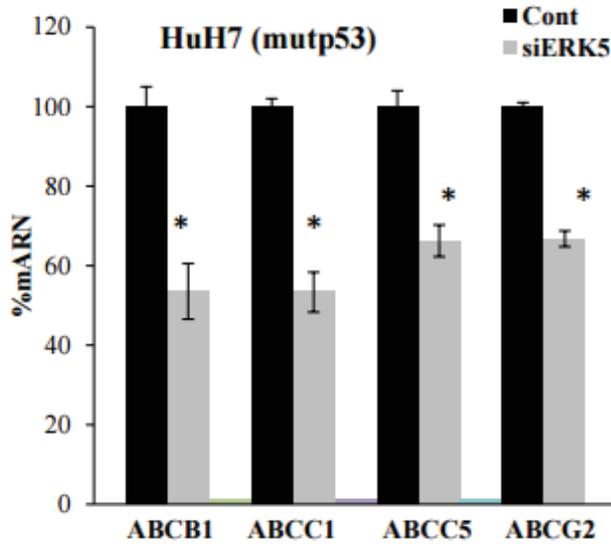
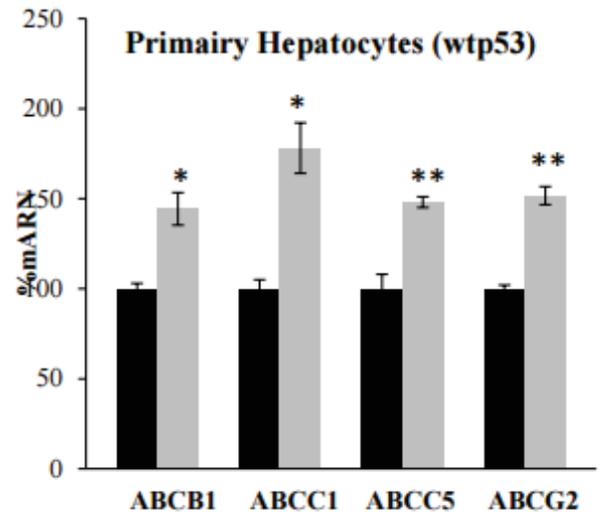


Fig.5

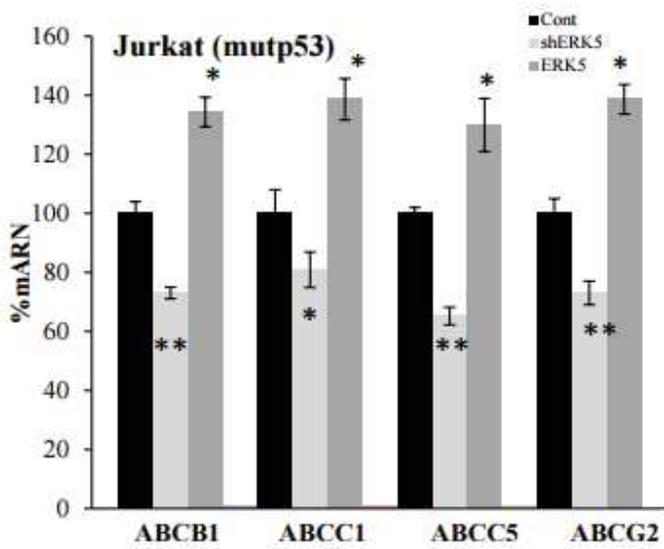
**A**



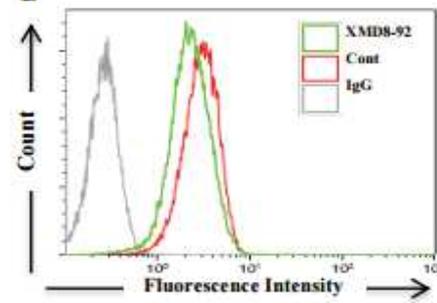
**B**



**C**



**D**



**Fig.6**

---

## **Partie 2**

### **Tumor Metabolism Regulates Sensitivity to NK Cells**

#### **Résumé:**

La plupart des cellules tumorales présentent une reprogrammation métabolique connue sous le nom d'effet Warburg. Dans le contexte des cancers hématologique cette reprogrammation permet aux cellules cancéreuses d'utiliser la glycolyse anaérobie pour générer l'ATP au lieu de la phosphorylation oxydative.

Cette spécificité métabolique offre certains avantages aux cellules cancéreuses: une prolifération rapide et une évation immunitaire qui implique la sous-régulation de l'expression du MICA/B et ULBP1, ligands de stress exprimés à la surface des cellules cancéreuses.

Les molécules MICA/B et ULBP1 jouent un rôle crucial dans l'activation et la costimulation de cellules effectrices de l'immunité innée et adaptative, principalement par leur capacité de lier et d'activer le récepteur activateur NKG2D. Le signal induit par l'interaction MICA/B:NKG2D ou ULBP1:NKG2D et sa dysfonction est impliqué dans de nombreuses pathologies auto-immunes, dans le contrôle et l'échappement tumoral et dans le contrôle des réponses antivirales.

Dans nos expériences, nous forçons les cellules leucémiques à produire de l'énergie par phosphorylation oxydative en les incubant avec le DCA.

Notre objectif était d'induire une augmentation de la transcription et de l'expression du MICA/B et ULBP1 pour assurer une activation optimale des cellules NK.

Nos résultats ont montré que le DCA utilisé à faible dose (1 $\mu$ M et 5 $\mu$ M) peuvent stimuler l'expression des ligands de stress MICA/B et ULBP1 à la surface des cellules tumorales induisant alors une activation beaucoup plus importante de cellules NK.

L'utilisation de DCA en combinaison avec une approche d'immunothérapie à base des cellules NK représente une piste thérapeutique prometteuse d'avenir, non seulement, pour éliminer les cancers mais aussi pour améliorer la qualité de vie des patients.

## 1. l'effet de DCA sur l'expression des ligands MIC, MICB et ULBP1 chez les lignées cellulaires AML:

Le dichloroacétate est une molécule utilisée habituellement en clinique pour traiter des troubles mitochondriaux. Il agit par inhibition du pyruvate déshydrogénase kinase, ce qui favorise l'entrée de pyruvate dans le cycle de Krebs et donc l'arrivée de substrat au niveau de la mitochondrie.

Récemment Michelakis et ses collaborateurs ont prouvé l'effet anti-tumorale de DCA, notamment dans le gliome, (**Bonnet et al., 2007; Michelakis et al., 2010**) par l'activation des voies de l'apoptose d'où la surexpression des protéines Bad, Puma, p53....

Un des mécanismes d'action possible du DCA pour empêcher la prolifération tumorale serait probablement via l'augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques, qui permettent d'activer p53 et de ce fait d'initier l'apoptose (**Villalba et al., 2013**).

Notre équipe a bien montré que le DCA stimule la sensibilité des cellules tumorales face aux cellules NK et induit l'expression de p53, gène suppresseur de tumeur qui intervient dans la régulation de la prolifération cellulaire, chez les cellules ayant un phénotype normal de p53 (wt-p53) (p53 sauvage) (**Allende-Vega, 2015**).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Bush et ses collaborateurs qui ont montré que le DCA induit l'expression de p53 (**Bush Li 2002, Int J cancer**) chez les cellules wt-p53 alors qu'il induit un effet contraire chez les cellules ayant une expression anormale de p53 (p53 muté ou p53 null) (**Chin Ueda science 1992**).

En conséquence, une meilleure compréhension des signaux et des mécanismes par lesquels le DCA favorise la mort des cellules tumorales est nécessaire pour comprendre son mode d'action.

D'autre part, des études récentes ont suggéré que le métabolisme des cellules cancéreuses et l'évasion immunitaire peuvent être deux phénomènes liés, et que le métabolisme des cellules cancéreuses peut amener à l'échappement immunitaire.

Dans ce contexte on a essayé de proposer un concept thérapeutique novateur avec une nouvelle thérapie combinatoire pour le traitement de cancers hématologiques.

Cette thérapie est basée sur l'induction de changements métaboliques par l'utilisation de dichloroacétate associée avec l'immunothérapie en utilisant les cellules NK activées *in vitro*. Cette étude servira à créer une nouvelle thérapie anti-cancer efficace, par le développement de nouveaux protocoles métaboliques visant à augmenter les signaux de stress générés par les

ligands des récepteurs activateurs pour activer efficacement les cellules NK (**Unni et al., 2008 ;Chan et al., 2010**). Les protéines MICA/B ainsi que les ULBP1 sont des ligands du récepteur activateur NKG2D impliqué dans les réponses anti-tumorales et antivirales.

Notre but était donc de vérifier l'effet de DCA sur l'expression des ligands de stress MICA, MICB et ULBP1 chez les cellules OCI-AML3, qui exprime normalement p53 (wtp53) (**Allende-Vega, 2015**)

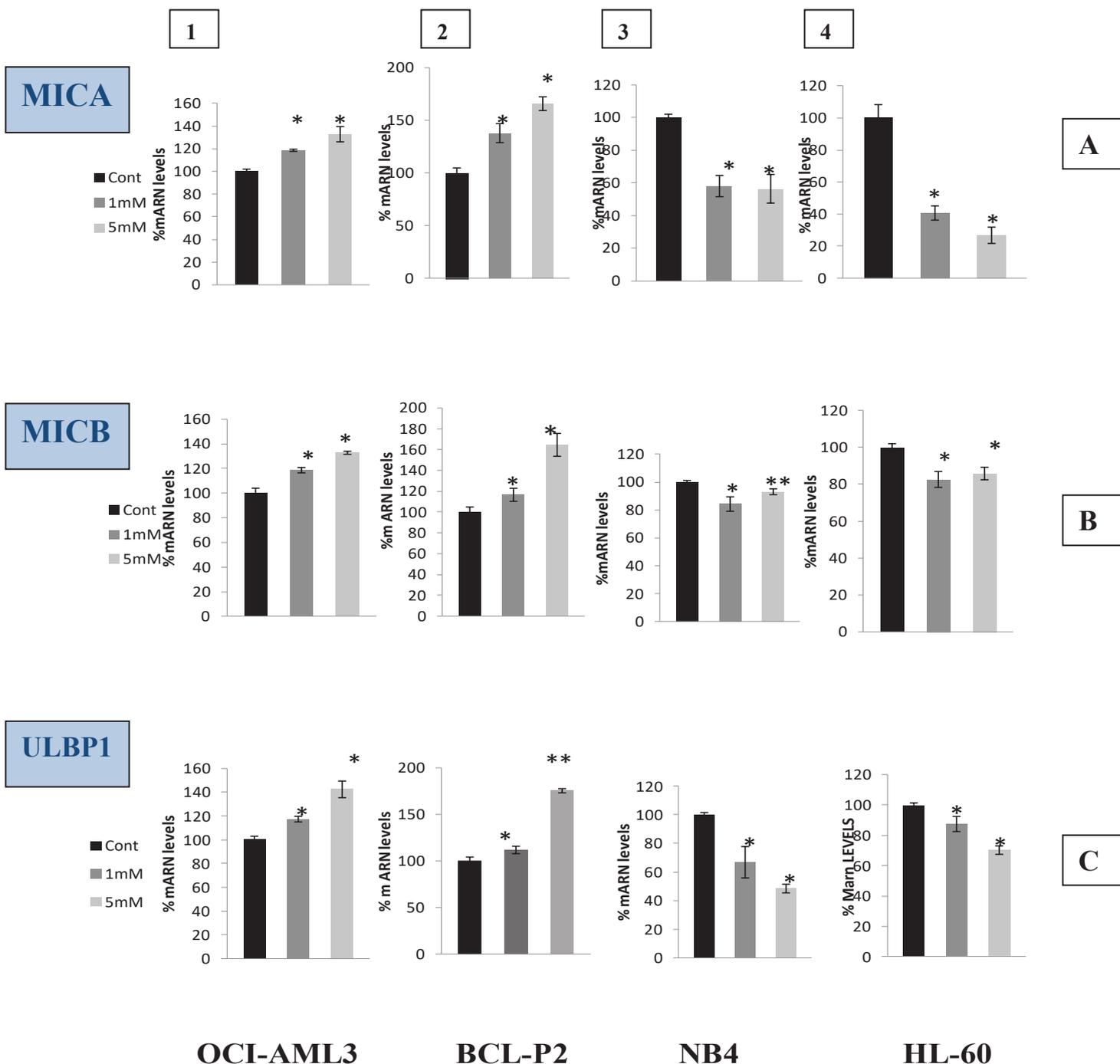
D'après nos résultats on a pu confirmer que le DCA favorise l'expression de l'ARNm de MICA (**figure 1.A.1**) MICB (**figure 1.B.1**) et ULBP1 (**figure 1.C.1**) chez les cellules OCI-AML. Ces résultats sont confirmés par la mesure de l'expression protéique qui augmente après traitement de DCA pendant une semaine (**figure 2 A**).

Cependant chez les lignées cellulaires HL-60, qui n'exprime pas de p53, on note une diminution de taux d'ARNm (**figure 1.A3, B3, C3**) et de protéines (**figure 2B**).

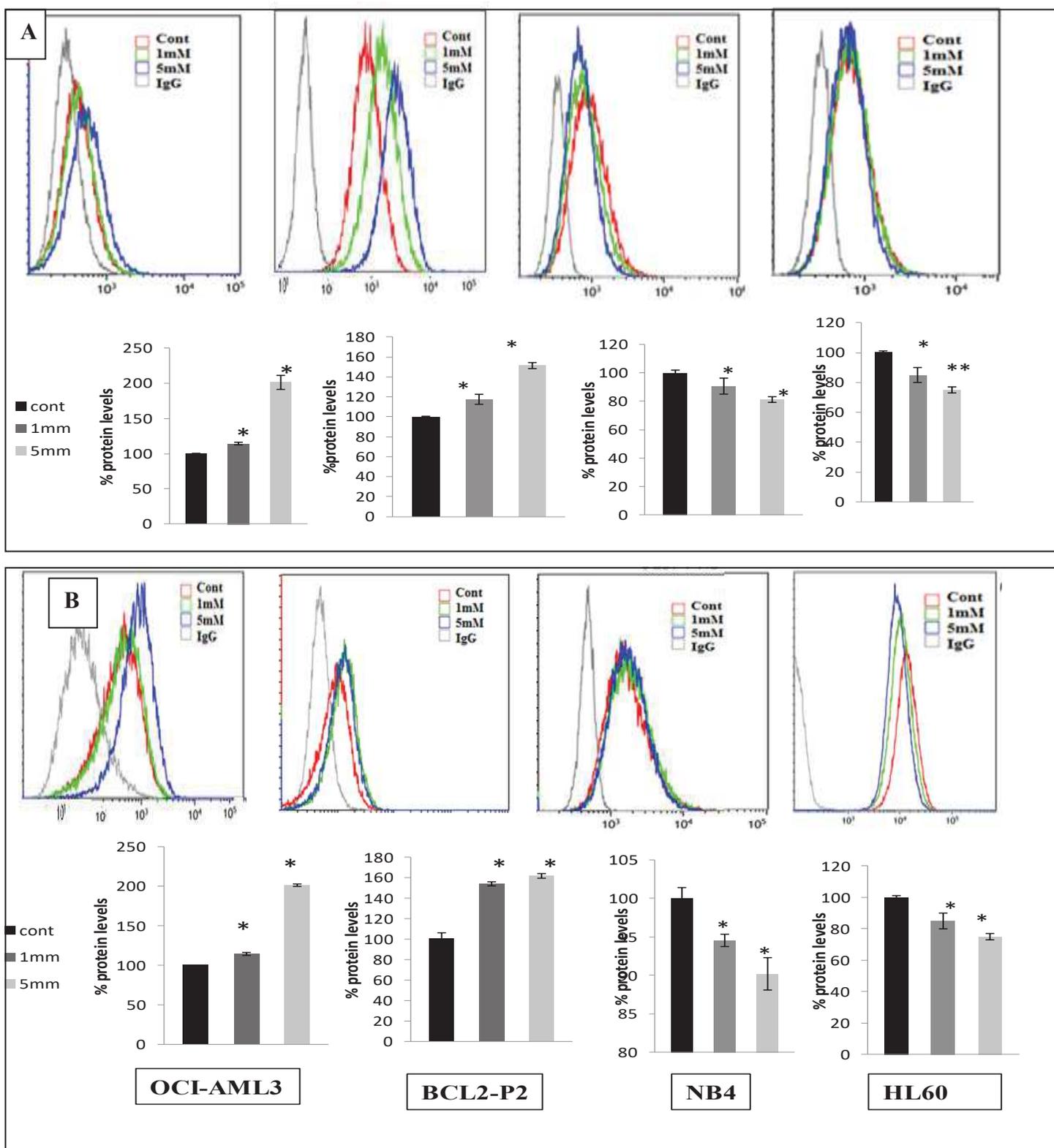
Le même effet de DCA est observé chez d'autres lignées AML ayant un statut de p53 mutant, les cellules NB4 qui, après traitement avec une concentration de 1 et 5 mM de DCA pendant une semaine, diminuent la transcription (ARNm) (**figure 1.A.4, B4, C4**) et la traduction (**figure 2C**) des gènes codant pour les ligands MICA, MICB et ULBP1.

On a confirmé aussi nos résultats chez les cellules primaires extraites de patients atteints de lymphomes (B-cell lymphoma) (BCL) (**figure 1.A2, B2, C2**). Il nous semblait donc que l'expression de MICA/B et ULBP1 est probablement dépendante de l'expression de p53 aux niveaux de cellules.

Figure 1: Effet de DCA sur l'expression des ligands MICA/B et ULBP1:



**Fig 1:** lignées hematopoitiques AML, 1)OCI-AML 3)NB4 4)HL60 et 2) lignée primaire des cellules de patients atteints de BCL (Lymphome) sont traités avec 1mM et 5mM DCA pendant 1 semaine, dont une analyse de taux d'expression d'ARNm des A) MICA,B) MICB et C) ULBP1 a été analysé. Les resultats sont traités et convertie en pourcentage par rapport aux cellules controles ;un test statistique t-student a été réalisé pour comaprer les differents conditions dont tous nos resultats sont significatifs avec \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 .



**Fig 2:** Les lignées leucémiques OCI-AML, NB4 et HL60 ainsi que les cellules des patients atteints de B-cell lymphomas (BCL-P2) sont cultivées dans un milieu contenant 1mM et 5mM DCA pendant une semaine. Ces cellules sont par la suite marquées par deux anticorps spécifiques reconnaissant les protéines MICA/B et ULBP1. Les résultats, répétés trois fois, sont traités et convertis en pourcentage par rapport aux cellules contrôles ; un test statistique t-student a été réalisé pour comparer les différentes conditions dont tous nos résultats sont significatifs avec \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 2. Effet de DCA sur l'expression de MICA/B et ULBP1 est-il dépendant du statut p53 des cellules tumorales?

Durant les années 1960 et 1970 quand les études sur les tumeurs représentaient la voie la plus étudiée, plusieurs groupes ont reporté l'existence d'une protéine qui était sous-exprimée dans plusieurs tumeurs. Cette protéine, avec un poids moléculaire approximatif de 53 kD a été baptisée p53 (protein 53) (**Levine et Oren, 2009**) et fut couronné "molécule de l'année" par la revue Science (**Culotta et Koshland, 1993**).

La protéine p53 a été définitivement retenue comme "suppresseur de tumeurs" quand des chercheurs ont démontré que des souris déficientes en p53 étaient capables de développer des tumeurs spontanément (**Donehower et al, 1992**). Les souris p53 knockout (KO), malgré un développement normal, avaient une incidence élevée de sarcomes et de lymphomes en jeune âge.

En effet, les mutations de p53 sont l'événement génétique le plus fréquent dans un large spectre de cancers, leur fréquence varie selon les types de cancer (de +/- 10 % dans des tumeurs hématopoïétiques jusqu'à 50 à 70 % dans les cancers de l'ovaire ou les cancers colorectaux) (**Brosh et Rotter, 2009**). En raison de son rôle majeur dans le développement du cancer, de nombreuses études ont essayé d'éliminer les cellules portant un p53 mutant ou de réactiver celui-ci de façon à induire l'arrêt de croissance (**Szelechowski et Saïb, 2005**).

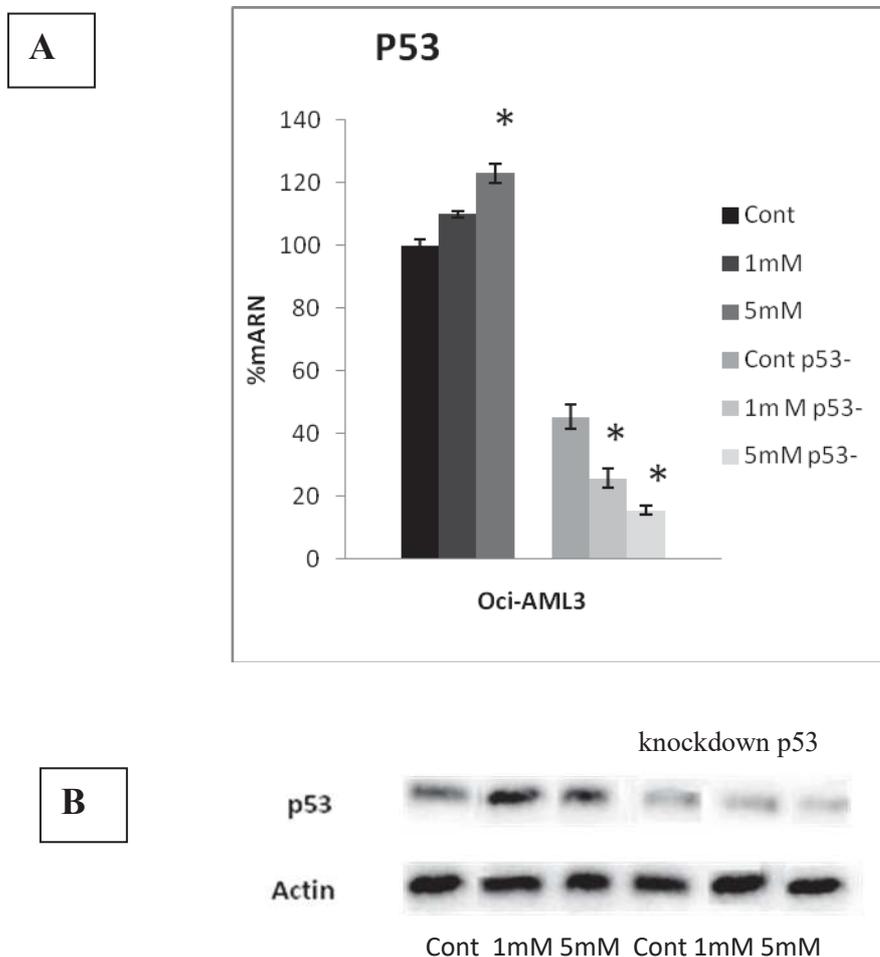
Actuellement ces essais n'ont pas prouvé une efficacité notable cependant plusieurs équipes continuent à explorer cette voie (**Myers et al. 2005**).

D'après nos résultats, on a pu suggérer que l'effet de DCA pourrait probablement être dépendant de la protéine p53. Il nous paraît alors intéressant de vérifier cette idée car la voie de signalisation touchée par le DCA et qui induit l'expression de ces ligands pourrait être une cible prometteuse dans l'avenir pour éliminer les cellules tumorales.

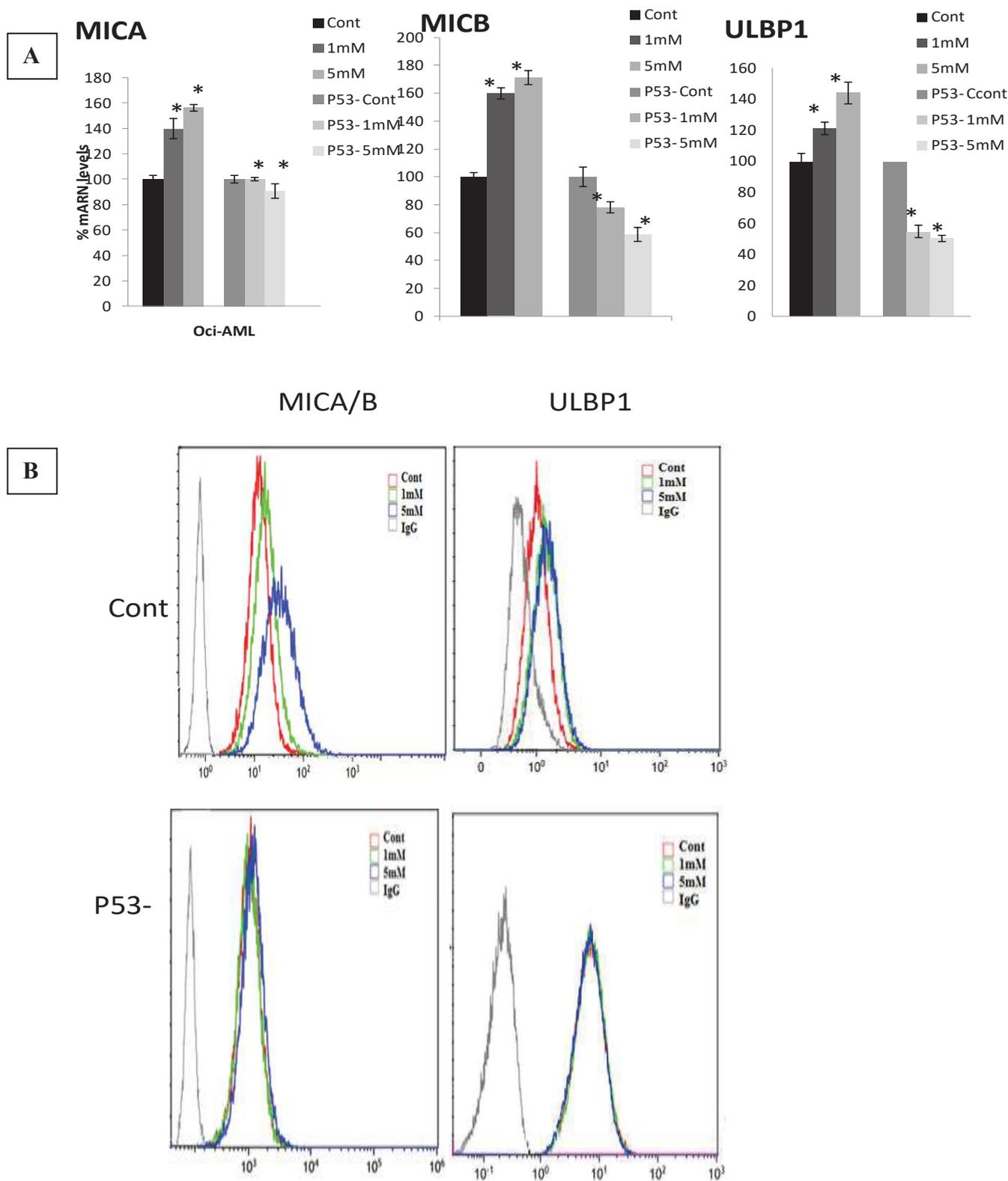
Dans le but de confirmer cette idée on a transfecté les cellules OCI-AML (wtp53) par un plasmide qui sert à atténuer l'expression de p53 (**figure 3**).

Bien que nous avons constaté depuis nos résultats précédentes que le DCA permet la surexpression des ligands de stress MICA, MICB et ULBP1 (**figure 1 et 2**). Cependant ces effets ont été observés chez les cellules ayant une expression normale de p53 (wtp53). Ainsi, après transfection on a bien constaté que les cellules OCI-AML KO en p53 (p53-), en présence de DCA, ne présentent aucune modification d'expression des ARNm des MICA, MICB et ULBP1 (**figure 4A**) au contraire des cellules OCI-AML contrôles (wtp53). Au niveau protéique, l'analyse par cytométrie en flux de l'expression membranaire des ligands MICA/B et ULBP1 confirme nos résultats précédents (**figure 4 B**).

A ce stade il est bien évident que l'action de DCA sur l'expression des ligands est dépendent de p53 mais ca nécessite encore plus d'expériences.



**fig 3:** La lignée leucémiques OCI-AML cultivée dans un milieu contenant 1mM et 5mM DCA pendant une semaine. Ces cellules sont par la suite transfecté par un plasmide pour atténuer l'expression de p53. Après 36h de transfection, une extraction A) d'ARNm et B) des protéines a été réalisé. Les résultats de knockdown ont été répéter trois fois, sont traités et convertie en pourcentage par rapport aux cellules contrôles ; un test statistique t-student a été réalisé pour comparer les différentes conditions dont tous nos résultats sont significatifs avec \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



**Fig 4:** Les cellules OCI-AML3 traité avec 1mM et 5mM de DCA pendant une semaine puis transfecté par un plasmide qui inhibe l'expression de p53. Après 36h de culture, une analyse de l'ARNm et de l'expression protéique des molécules MICA, MICB et ULBP1 a été effectuée. Les résultats sont traités et convertis en pourcentage par rapport aux cellules contrôles ; un test statistique t-student a été réalisé pour comparer les différentes conditions dont tous nos résultats sont significatifs avec \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,

### 3. La modification de l'expression des ligands MICA, MICB et ULBP1 peut moduler la capacité cytotoxique des cellules NK:

Les cellules NK sont des acteurs majeurs de la vigilance anti-tumorale. Ces cellules de l'immunité innée ont la capacité, comme leur nom indique, de lyser directement les cellules cibles sans léser les cellules normales (Zompi et Colucci, 2005). Elles participent également à l'immunité adaptative par sécrétion de cytokines et par cytotoxicité médiée par les anticorps via leur CD16 qui se lie aux immunoglobulines de type G fixées à la surface des cellules cibles (Cullen et Martin, 2008; Critchley-Thorne et al., 2009). La mort des cellules cibles est induite de façon i) dépendante ou ii) indépendante de la perforine. En effet, au contact de la cible la perforine et les granzymes, libérés des granules cytosoliques par exocytose, sont des effecteurs de la cytotoxicité. Indépendamment de la perforine, des ligands aux récepteurs de mort, Fas-L et TRAIL, exprimés à la surface des cellules NK, peuvent également induire la lyse cellulaire (Zompi et Colucci, 2005). La caractérisation fonctionnelle des cellules NK a permis d'identifier différents récepteurs capables d'inhiber ou de stimuler leur cytotoxicité (Vivier, E. 2006). Cette activité cytotoxique anti tumorale est majoritairement contrôlée par le récepteur activateur NKG2D exprimé sur les cellules NK (Zafirova et al., 2011). En effet, des souris déficientes en NKG2D sont d'avantage prédisposées à développer divers cancers et à en mourir précocement (Guerra et al., 2008). Ce récepteur reconnaît plusieurs ligands dont le plus connu est les protéines MICA, MICB et ULBP1 qui peuvent être régulées aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel. On a bien montré que le DCA permet la modification de ces ligands dans divers types de tumeurs (figure 1,2,3).

Les cellules NK exercent leur activité lytique vis-à-vis de cellules cibles exprimant plus les ligands de stress (Vivier, 2006). Comme nous avons bien établie que le DCA stimule l'expression des ligands de stress chez les cellules OCI-AML, BCL-P2, notre objectif était donc de vérifier si la neutralisation des cellules tumorales par les cellules NK est médiée par la voie impliquée NKG2D/MICA;MICB;ULBP1.

Pour vérifier si l'expression de ces ligands peut vraiment induire une activation des cellules NK on a testé la cytotoxicité de ces cellules faces aux cellules tumorales leucémiques (OCI-AML, NB4 et HL60) et les cellules primaires de patient atteint de B-cell lymphome..

Nous avons observé que les cellules NK sont capable de neutraliser les cellules tumorales ayant une expression accrue en MICA, MICB et ULBP1 beaucoup plus que les cellules tumorales contrôles. Les cellules tumorales incubées avec DCA sont beaucoup plus sensibles à l'action des cellules NK que les cellules contrôles. Cet effet est observé uniquement chez les cellules OCI-

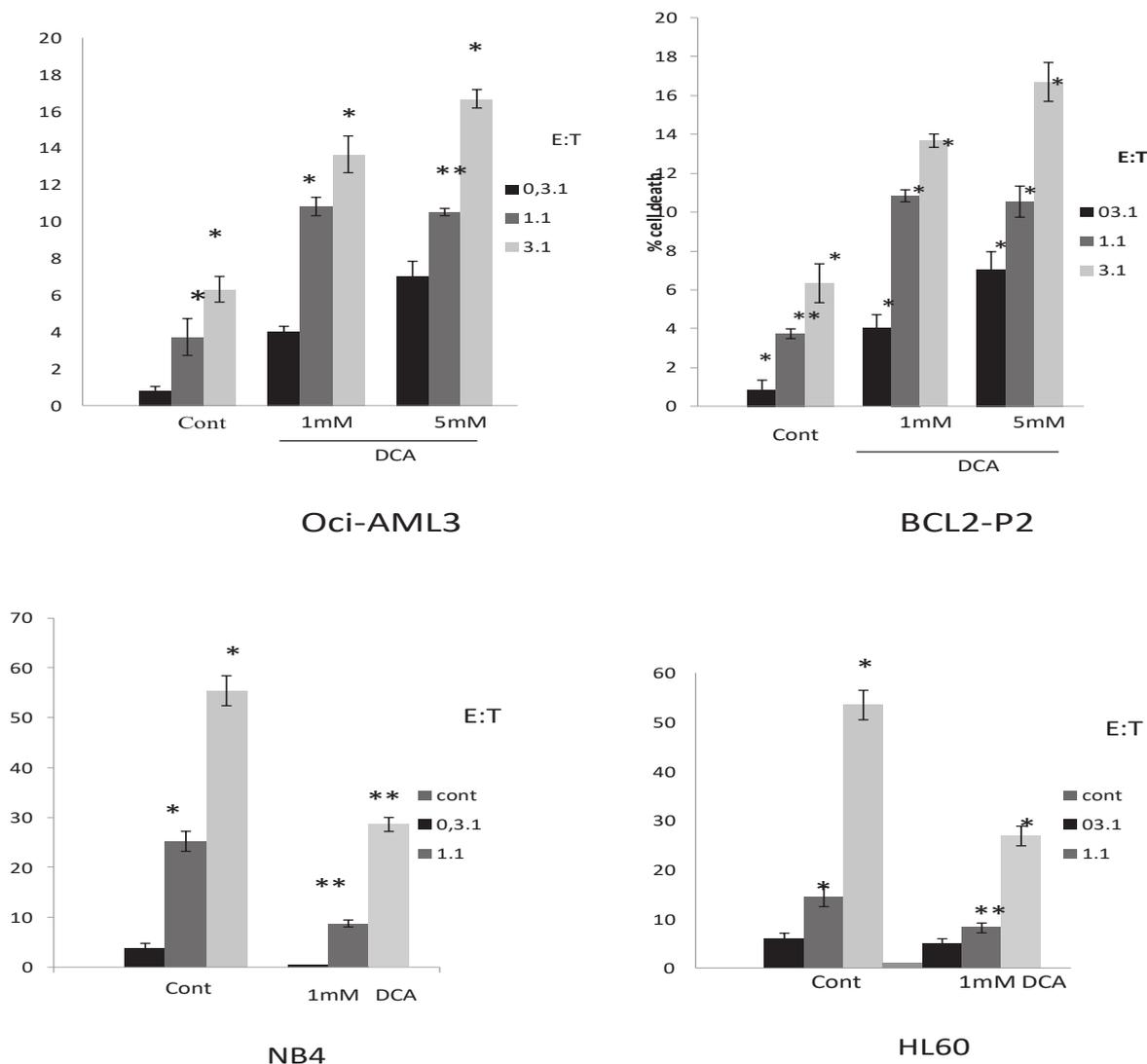
---

AML3 et BCL (P2) ayant une expression normale de p53 par contre dans le cas des cellules NB4 et HL60 qui n'ont pas une modification d'expression des MICA/B et ULBP1 on a bien constaté que ces lignées ne sont pas sensibilisées à l'action de DCA.

Pour vérifier si la cytotoxicité des cellules NK face aux cellules tumorales est dépendante de l'expression des ligands, on a mis en culture les cellules transfectés (KOp53) incubées pendant 72h en DCA, avec différents ratio des NK. Nous avons déterminé que les cellules ayant une expression altérée de p53 sont moins sensibles à l'action des cellules NK par rapport aux cellules contrôles.

Le DCA peut alors être utilisé en clinique, en combinaison avec l'immunothérapie à la base des cellules NK, pour induire une action optimale des cellules NK afin qu'elles puissent éliminer les cellules tumorales et donc conduire à la création d'outils innovants pour l'immunothérapie chez les patients ayant un phénotype normale de p53.

En conclusion, élucider les mécanismes d'actions par lequel le DCA peut induire la surexpression des ligands spécifiques de NKG2D, nous paraît importants afin de cibler ces voies de signalisations pour combattre le cancer.



**Figure 5:** Les lignées leucémiques OCI-AML, NB4 et HL60 ainsi que les cellules des patients atteints de b-cell lymphomas (BCL-P2) sont cultivées dans un milieu contenant 1mM et 5mM DCA pendant une semaine. Ces cellules sont par la suite mis en culture avec les cellules NK activées in vitro pendant 21 jour. La coculture des cellules NK (E) avec les cellules cible (T) se fait selon 2 ratio 0.5:1 (E:T) et 1:1 (E:T) pendant une nuit. Un test de cytotoxicité a été réalisé par l'utilisation de l'anticorps 7-AAD. Les résultats, répété trois fois, sont traités et convertie en pourcentage des cellules mortes par rapport aux cellules vivantes ; un test statistique t-student a été réalisé pour comparer les différents conditions dont tous nos résultats sont significatifs avec \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

# **Discussions Générales**

Le cancer du sang est l'un des cancers qui résistent à la plupart des chimiothérapies classiques. Il y a quelques années encore, la survie globale des patients atteints de cette maladie n'est améliorée. Les études réalisées sur le profil métabolique des cellules cancéreuses ont montré que la plupart des cellules cancéreuses partagent une particularité métabolique en utilisant la fermentation lactique au lieu de la phosphorylation oxydative comme source d'énergie connue sous le nom d'effet Warburg (**Warburg et al., 1965 ;Scott et al., 2011;Villalba et al., 2013**). D'après Warburg les cellules cancéreuses présenteraient un défaut au niveau de leurs mitochondries (**Warburg et al., 1965**). Un mauvais fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est une source majeure de ROS (Reactive Oxygen Species). Or ces derniers induisent la stabilisation des facteurs de transcription HIF, responsables de la surexpression de nombreuses enzymes de la glycolyse (**Semenza et al., 2010**). De plus, les dommages oxydatifs induits par les ROS sont probablement la source majeure d'instabilité au niveau du génome mitochondrial, entraînant des dysfonctionnements au niveau de la chaîne respiratoire (**Gogvadeze et al., 2010**).

Plus récemment d'autres hypothèses ont émergé, suggérant que le microenvironnement tumoral a un rôle prépondérant dans la "sélection" des cellules les mieux adaptées. En effet lors de la croissance tumorale, les cellules cancéreuses proliférant de façon anarchique, des zones d'hypoxie apparaissent au sein de la tumeur, stabilisant les facteurs de transcription HIF(Hypoxia-Inducible Factor).Ce dernier peut être directement activé par des oncogènes (**Kroemer et Pouyssegur ,2008**).Ces protéines vont activer la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse (enzymes glycolytiques ,transporteurs de glucose).Dans les conditions normoxiques, l'expression de HIF est augmentée suite, probablement, à des mutations sur des gènes régulant négativement ce facteur de transcription ou aussi suite à des mutations sur certains gènes codant les enzymes du cycles de Krebs (fumarate hydroxylase,succinate déshydrogénase) qui peuvent stabiliser HIF via une inhibition des prolyl-hydroxylases par accumulation de succinate ou de fumarate (**DeBerardinis et al., 2008**). Enfin, la dernière possibilité pour expliquer le changement métabolique des cellules cancéreuses concerne les oncogènes/gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, le facteur de transcription p53 a été récemment impliquée dans le contrôle de métabolisme via TIGAR, qui active la production d'ATP par les phosphorylations oxydatives (**Green et Chipuck,2006**).De plus, p53 induit la transcription de la cytochrome C oxydase, une sous-unité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Bensaad et al., 2006**). Enfin ,la perte de p53 stabilise le facteur de transcription HIF (**Kaur et al., 2005**) et induit une modification du métabolisme des cellules. De même, certains oncogènes peuvent également entraîner une modification du métabolisme .Ainsi la mutation de Ras favorise un métabolisme glycolytique (**Hsu et Sabatini, 2008**) et c-Myc, un oncogène qui induit la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme (**Gordan et al., 2007**).

Dans ce contexte, la glycolyse semble être une bonne cible thérapeutique pour éliminer les cellules cancéreuses. L'équipe de Fantin a montré que l'inhibition de la glycolyse peut stimuler la respiration mitochondriale dans le cancer du sein, suggérant ainsi que l'augmentation du pool de pyruvate disponible pour être transformé en Acetyl CoA pourrait également induire la réactivation de la phosphorylation oxydative (**Fantin et al., 2006**). De plus, l'équipe de Bonnet a relevé l'importance du pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) dans les glioblastomes. Cette enzyme dont la transcription est activée par HIF (**Kim et al., 2006**) inhibe par phosphorylation la pyruvate déshydrogénase (PDH), responsable de la catalyse de pyruvate en Acetylcoenzyme A (Ac-CoA) et donc de l'arrivée de substrats au niveau de la mitochondrie. Ainsi, l'inhibition de PDK, via un siRNA ou en utilisant un inhibiteur pharmacologique telle que le dichloroacetate (DCA) (**Stacpoole et al., 2008**), diminue de manière significative la glycolyse et favorise l'oxydation du glucose dans la mitochondrie. L'inhibition de cette protéine dans les glioblastomes n'induit pas seulement une réactivation de la phosphorylation oxydative, mais également la mort des cellules tumorales par apoptose (**Bonnet S. et al., 2007**). Le DCA a été utilisée depuis longtemps dans les traitements hypocholestérolémiant (**Misbin R, 1979**) et plus récemment il a prouvé son efficacité à tuer les cellules tumorales.

Des résultats pertinentes de DCA ont été publiés par l'équipe de Evangelos Michelakis affirmant que le DCA est capable de modifier le métabolisme des cellules cancéreuses, de restaurer la phosphorylation oxydative, d'entraîner la production de ROS et d'induire la mort des cellules tumorales par apoptose *in vitro* et *in vivo* (**Bonnet et al., 2007; Michelakis et al., 2010**). Depuis cette découverte, plusieurs équipes ont commencé à évaluer l'efficacité de DCA sur d'autre types de cancers.

Chez l'Homme plusieurs essais cliniques basés sur l'utilisation de DCA sont en cours d'évaluation sur divers types de cancer telques le cancer de sein (**Haugrud AB et al., 2014**), du prostate (**Akbar Khan et al., 2011**) colorectales (**Madhok et al., 2010**), neuroblastome (**Benedikt F et al., 2015**) endométriales (**Jason Y et al., 2008**) sans léser les cellules saines de l'organisme.

La dose administrée aux patients atteints de cancer s'est avérée non toxique pour le système rénal, le système cardiaque, le système hépatique et le système hématologique. On a utilisé les mêmes doses utilisés en cliniques dans tous nos expériences (**Dimlich R et al., 1989**) (10mM de DCA pour les traitements de leucémie aigue et 1mM et 5mM pour les leucémies chroniques), puisque il avait été noté que ,utilisé à des doses élevées, le DCA peut induire des effets secondaires telles que la neuropathie périphérique, qui s'était inversée lorsque la dose avait été abaissée (**IARC, 2009**).

Malgré la capacité du DCA à inhiber le cancer et la croissance tumorale Michelakis avait souligné, qu'il était trop tôt pour dire si le DCA fournira un traitement efficace contre le cancer chez les êtres humains puisque son mode d'action reste encore mal connu (**ISIS, 2012**) .

Elucider les voies de signalisations modifiées par DCA nous paraît essentiel pour une approche thérapeutique prometteuse. D'où notre objectif était d'évaluer l'efficacité de DCA sur les cancers de sangs.

De façon intéressante, il a été récemment montré que des molécules hypoglycémiantes, comme la metformine, associées avec des traitements chimiothérapeutiques classiques peut induire la mort des cellules cancéreuses issues de cancer de sein et bloquer la croissance tumorale (**Hirsch et al., 2009**). Depuis plus que 70 ans la chimiothérapie représente le traitement le plus utilisé en cas des cancers (**Alfred Gilman 1934**). Plusieurs cancers, comme la maladie de Hodgkin, la leucémie, les lymphomes, les tumeurs testiculaires et certains sarcomes, peuvent être guéris (**Les guides de la fondation québécoise du cancer**) grâce à la chimiothérapie (**Lechat P., 2006**). D'autres cancers que l'on croyait incurables, tel le cancer du sein, répondent très bien au traitement par chimiothérapie, surtout s'il est administré tôt dans le processus de la maladie. Cependant certaines cellules deviennent chimiorésistantes à certains types d'agents chimiothérapeutiques. Cette chimiorésistance est généralement associée à la surexpression des transporteurs membranaires (familles des transporteurs ABC) responsables de l'efflux de drogues.

Notre projet de thèse est divisé en deux axes majeurs.

La 1ère partie consiste à utiliser une molécule qui peut réduire l'expression protéique des transporteurs, ce qui va faciliter l'accumulation des drogues à l'intérieur des cellules tumorales.

A l'issue de ces travaux de thèse, nous nous sommes demandé si l'ensemble des données accumulées, de façon combinée à la littérature, pouvait conduire à envisager les ABC comme une cible pharmacologique dans une stratégie anticancéreuse. Dans un premier temps, il faut rappeler que l'approche thérapeutique visant les transporteurs ABC permet de cibler une résistance à la fois agent-spécifique et cancer spécifique. Malgré la disponibilité tissulaire des transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC5 et l'ABCG2, ils sont exprimés de façon beaucoup plus restreinte dans les tissus sains (mélanocytes, rétine, glandes mammaires, estomac et testicules) (**Frank et al., 2005**). De plus, la surexpression de ces transporteurs a été retrouvée dans de nombreux types de cancers tel que les cancers du sein (**Yang et al., 2010**), du foie (**Cheung et al., 2011**), colorectaux (**Wilson et al., 2011**) et dans des leucémies (**de Grouw et al., 2006 ; Lehne et al., 2009**). Enfin, une validation de concept a déjà été développée dans la littérature avec un traitement par un anticorps anti-ABCB5 induisant une inhibition de la prise et de la croissance tumorale *in vivo* (**Schatton et al., 2008**).

Au cours de notre étude, nous avons essayé d'apporter des arguments en faveur de l'association des transporteurs étudiés avec la chimiorésistance. Dans les modèles que nous avons utilisés, l'expression des transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC5 et ABCG2, connus pour leur importance dans les phénomènes de résistance des cancers, est réprimé suite à l'action de DCA pour les cellules ayant un statut normale de p53 (wtp53). Il est intéressant de noter que les cellules leucémiques

---

ayant une expression de protéine p53 mutée pourraient augmenter l'expression des transporteurs ABC et devenir chimiorésistantes en cas d'induction de la phosphorylation oxydative.

Lorsque des agents ciblant ABCB1 ont été développés, la littérature était très documentée sur son rôle fonctionnel physiologique et pathologique dans les cancers (**Dauchy et al., 2008**). L'expression de ces transporteurs avait été étudiée à l'échelle de l'organisme grâce à des souris knock-out permettant d'établir que la perte de ces transporteurs conduisait à des animaux viables et fertiles, avec toutefois une hypersensibilité à certains composés (**Dauchy et al., 2008**). Ces différentes études avaient donné l'espoir que les transporteurs ABC puissent constituer des cibles pharmacologiques intéressantes dans le domaine de la cancérologie avec toutes les limitations que nous leur connaissons aujourd'hui. Concernant l'ABCC5, l'état de l'art est bien moins avancé et ni son rôle physiologique ni son rôle pathologique ne sont clairement identifiés (**Natesh et al., 2016**). Aucune souris transgénique knock-out pour ABCC5 n'a par ailleurs été réalisée. Des données *in vitro* et *in vivo* restent donc à établir avant de pouvoir envisager le transporteur ABCC5 comme cible pharmacologique dans le cadre du cancer de sang (**Natesh et al., 2016**).

Notre but était de comprendre la relation entre le métabolisme et les transporteurs ABC. Si ces protéines pourraient être bloquées, la concentration intracellulaire en agent anticancéreux serait suffisante pour qu'elle soit active. C'est ainsi que nous nous sommes aperçus que le DCA, utilisé depuis longtemps en clinique, joue un rôle primordial sur la cytotoxicité cellulaires grâce à son action sur l'expression de certains transporteurs ABC.

Devant notre réussite à trouver une molécule capable d'inhiber l'efflux des molécules chimiothérapeutiques par les transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC5 et ABCG2 chez des lignées cellulaires, nous avons essayé de vérifier cette approche sur des lignées primaires humaines et sur des modèles *in vivo*.

Nous avons constaté que l'efficacité de DCA à diminuer l'efflux de daunorubicine suite à la sous-régulation de l'expression des transporteurs ABC varie selon les cellules utilisées.

Selon nos résultats l'effet de DCA sur les transporteurs ABCB1 (**Jason A et al., 2002**), ABCC1, ABCC5, ABCG2 est p53-dépendent.

Pour vérifier nos résultats on a essayé d'utiliser le 17-AAG, inhibiteur de la protéine HSP90, capable de dégrader les p53 mutées par ubiquitination dépendent de MDM2 (**Allende-Vega, 2015**), on a montré que les cellules ayant une expression normale de p53, après traitement avec le 17-AAG, montrent les mêmes résultats que les cellules ayant une expression altérée de p53. Il est devenu alors indispensable d'identifier les mécanismes responsables de la diminution de l'expression des ABC. Notre équipe a pu montrer que les cellules qui utilisent la phosphorylation oxydative présentent une surpression de ERK5 (**Charni et al., 2010; Lopez-Royuela et al., 2014;**

**Khan et al., 2016; Villalba et al., 2013; Villalba et al., 2014; Catalán et al., 2015**) ce qui modifie probablement l'expression des ABC supportant alors l'hypothèse que l'inhibition de la voie ERK5/MEF2 pourrait probablement inhiber la chimiorésistance (**Pereira et al., 2016**) cependant cette idée il est encore mal connue.

La protéine kinase ERK5 est capable d'activer divers facteurs de transcription qui activent des promoteurs des gènes ABC telque le p53, NF- $\kappa$ B, NRF2, HIF1 et MEF2 (**Scotto et al., 2003**). Certains résultats ont confirmé que l'inhibition de la kinase ERK5 induit l'activation de p53 et favorise la sensibilité des cellules pour le 5-fluorouracil dans le cas de cancers de colon cependant le rôle des transporteurs n'est pas été mis en évidence (**Pereira et al. 2016**). Dans ce contexte, on a pensé que probablement cet effet est lié aux changements de l'expression des ABC.

D'après les résultats de notre équipe, le DCA favorise l'expression de ERK5 (**Lopez-Royuela et al., 2014**) et augmente l'expression de p53 (**Allende-Vega et al., 2015**) de FOXO3 et de certains gènes-cibles telque Puma, Bad et Noxa (**Mallinson J et al., 2012**) et il provoque ainsi une diminution de l'expression de ABCB1 dans les cellules wtp53 (**Xiang et al., 2015**) .

La protéine p53 est capable de réguler la transcription de nombreuses protéines pro-apoptotiques telles que les protéines à domaine BH3-seul Puma et Noxa (**Nakano et Vousden, 2001**). De plus, p53 peut non seulement induire la transcription de Bax, mais également l'activer directement au niveau cytoplasmique (**Chipuk et al., 2004**). Foxo3, un autre facteur de transcription, considéré également comme un suppresseur de tumeur, régule la transcription de Bim et il est capable d'interagir avec p53 en réponse à des stimuli de stress (**Fu et Tindall, 2008**) . Ces deux protéines ont donc un rôle important dans l'induction de l'apoptose et sont souvent dérégulées dans les cellules tumorales.

D'autre part, Wang et ses collaborateurs ont montré que l'expression des ABC modifiée par le stress oxydatif pourrait être médiée par NRF2 (**Ji et al., 2013 ; Wang et al., 2014** ).

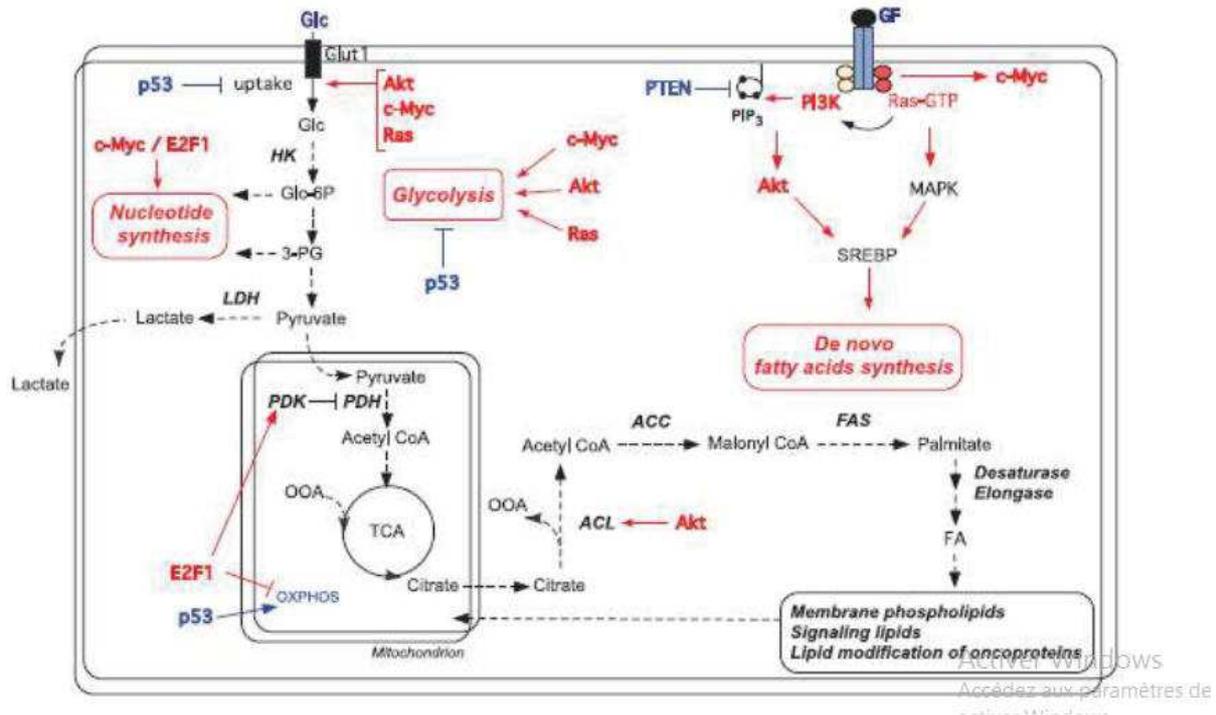
Récemment on a pu montré que ERK5 peut générer une réponse antioxydante par l'activation de NRF2 (**Khan et al., 2016**) et modifie l'expression de certains gènes qui interviennent dans le changement métabolique (**Chen et al., 2014 ; Seebacher et al., 2015**).

Nous avons (**Khan et al., 2016**) pu confirmé que MEF2 intervient dans la modulation de l'effet de ERK5 sur le métabolisme tumorale (**Lopez-Royuela et al., 2014; Khan et al., 2016**). Pour mieux comprendre la voie de signalisation spécifique touché par DCA on a vérifié que les transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC5 et l'ABCG2 possèdent des sites de liaisons spécifiques pour MEF2.

A cause de la variété des ligands spécifiques de ERK5 il nous a parait difficile de déterminer exactement lequel est responsable de la modification de l'expression protéiques de transporteurs ABC qui pourrait être p53 dépendent comme nous avons cité précédemment.

Nous avons vérifié cette hypothèse dans diverses lignées cellulaires, ainsi que dans des cellules issues de patients et dans un modèle *in vivo*. Ainsi, pour la première fois, nos expériences suggèrent que le mode d'action du DCA est lié à la voie de signalisation ERK-MEF2.

Ces conclusions ne sont encore que des hypothèses de travail et des études supplémentaires d'activité ATPasique sont nécessaires pour les confirmer ou les infirmer. L'étude de mécanisme d'action de DCA sur l'activité ATPasique permettra alors de cibler ces voies de signalisations dans des approches thérapeutiques dans l'avenir.



**Fig 49:** Modification du métabolisme cellulaire dans les cellules cancéreuses. Glc, glucose; HK, hexokinase; 3-PG, 3-phosphoglycérate; GF, facteur de croissance; SREBP, sterol-regulatory element binding protein; ACL, ATP citrate lysase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase; FA, acide gras. (Fits et Fajas, 2010)

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons tenté d'améliorer une méthode utilisée depuis longtemps pour combattre le cancer: L'immunothérapie.

Des nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses visant à stimuler le système immunitaire du patient vis-à-vis de sa tumeur ont été développées. Récemment, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé la mise sur le marché du premier vaccin thérapeutique contre le cancer de la prostate (vaccin Provenge (sipuleucel-T)). Ce vaccin est à la base de cellules mononuclées autologues du sang, chargées en culture avec la phosphatase acide prostatique

(antigène tumoral) couplée au GM-CSF. Cette protéine recombinante active *in vivo* les lymphocytes T spécifiques de la phosphatase acide prostatique (**Plosker et al., 2011**).

Dans notre étude, nous avons essayé de proposer une nouvelle approche de traitement pour les cancers hématologiques (leucémie, lymphome, et myélome) basée sur l'utilisation des cellules NK.

Notre hypothèse consiste à utiliser des molécules capables de moduler le métabolisme tumoral (DCA) en combinaison avec les cellules NK activées pour améliorer les résultats obtenus par l'immunothérapie seule.

Les interactions entre le système immunitaire et la cellule tumorale lors du développement cancéreux sont très complexes. En effet l'efficacité des réponses anti-tumorale pourrait être limitée par une variété de stratégies immunosuppressives.

Hanahan et Weinberg ont proposé en 2000 une série de 6 propriétés nécessairement acquises par les cellules au cours du processus de transformation : insensibilité aux inhibiteurs de croissance, autosuffisance, potentiel réplicatif illimité, capacités angiogéniques, évitement de l'apoptose, invasion tissulaire et potentiel métastatique (**Hanahan , 2000**). La capacité d'échappement au système immunitaire a récemment été décrite comme une 7ème caractéristique des cellules tumorales (**Dunn et al., 2004 ; Zitvogel et al., 2006**).

Il est bien évident que l'échappement à la réponse immunitaire constitue une cause majeure de l'échec des thérapies anticancéreuses (**Dunn et al., 2004 ; Zitvogel et al., 2006**).

Chez l'Homme, les mécanismes d'échappement à la réponse immune sont donc essentiellement étudiés à la phase chronique et à la phase de transformation tumorale. Par contre, il est difficile de savoir à partir de quel moment la fonction des cellules immunitaires commencent à se détériorer. Ainsi, nous savons que les cellules NK se mobilisent rapidement et peuvent donc jouer un rôle clé dans la résolution précoce de la transformation tumorale (**Woo et al., 2015**). On peut donc supposer qu'au moins quelques mécanismes d'échappement à la réponse NK sont déjà utilisés par les cellules tumorales. Il est évident que l'activation des cellules NK résulte d'un équilibre dynamique entre différents signaux activateurs et inhibiteurs transmis par des récepteurs membranaires qui reconnaissent des ligands constitutifs ou inductibles à la surface des cellules (**Groh et al., 1996 ; Classen et al., 2003; Verneris et al., 2004**).

En situation physiologique normale, l'expression constitutive de molécules HLA de classe I à la surface des cellules saines empêche l'activation des cellules NK (**Granzin et al., 2017**) et donc la destruction des cellules tumorales. Le NKG2D est l'un des récepteurs activateurs exprimé chez les cellules NK humaines, des cellules T  $\gamma\delta$  et T CD8+ mais il est très faiblement exprimé à la surface des cellules T CD4+ chez les individus sains (**Altmeyer et al., 2017**).

Chez l'homme, le signal activateur de NKG2D est transmis par la molécule adaptatrice DAP10 (**Xu et al., 2017**).

Pour s'échapper de la réponse des NK, les cellules tumorales induisent donc des modifications phénotypiques (modification de l'expression des molécules HLA-I telles MICA, MICB et ULBP1 (**Unni et al., 2008 ; Chan et al., 2010**) et/ou inhibition de ligands des récepteurs activateurs (NKG2D) (**Kaiser et al., 2007 ; Dupuy, 2012; Cheng et al., 2013**).

L'axe NKG2D/ligand apparaît de plus en plus important en immunité antitumorale, autoimmunité et lors des réponses au stress cellulaire (**Jiaying Set al., 2017**).

Bien que les molécules MICA et MICB ont une expression membranaire constitutive dans divers types cellulaires tel que l'épithélium intestinal (**Groh et al., 1996**), les monocytes (**Zwirner et al., 1998 ;Zwirner et al., 1999**), les macrophages (**Nedvetzki et al., 2007**) et les cellules épithéliales thymiques (**Cerboni et al., 2007**), leur expression est induite seulement en situation de stress (stress génotoxique, stress infectieux, ou stress métabolique..).

Récemment Stern -Ginossar a confirmé que les mi-ARN représentent l'un des mécanismes d'induction de l'expression des molécules MICA et MICB (**Stern-Ginossar et al., 2008**).Récemment il a été montré que le miR-17-92 est corrélé avec l'inhibition de l'expression de MICA/B dans le cancer des ovaires (**Xie et al., 2014**), glioblastome (**Stern-Ginossar et al., 2008**) et plusieurs autres type de cancers (**Codo et al., 2014**) ce qui favorise l'échappement tumorale de système immunitaire.

Quant au récepteurs NKG2D, il a été confirmé que certaines interleukines telque l'IL-15 peuvent stimuler leur expressions, (**Horng et al., 2007**). A l'inverse, le TGF- $\beta$ 1 a un effet opposé puisque il diminue l'expression de surface et la fonction du couple NKG2D/DAP10.

Dans un autre contexte, des mutations touchant le gène MICA peuvent modifier aussi le taux d'expression du ligand (**Shafi et al., 2011**).

Ainsi, l'étude de système de réponse MICA/NKG2D est particulièrement indiquée dans les pathologies inflammatoires et autoimmunes du tube digestif. Les maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), la maladie de Crohn (MC) (**Allez et al., 2007**), et larectocolite hémorragique (RCH), sont caractérisées par une réponse immune non contrôlée vis-à-vis de la flore intestinale (**Tieng et al., 2002**).

Pariente et ses collaborateurs ont montré que le stress bactérien peut induire l'expression de MICA à la surface des cellules épithéliales intestinales (**Pariente et al., 2011**). Certaines souches de E. coli («Diffusely Adherent E. coli», DAEC) induisent l'expression de MICA par la liaison de l'adhésine bactérienne au récepteur de surface cellulaire CD55. Ces souches ont été par ailleurs identifiées comme pouvant coloniser la muqueuse intestinale des patients atteints de MC (**Pariente et al.,**

2011). Les ligands de NKG2D jouent un rôle primordial dans l'immunosurveillance et peuvent être impliqués dans les mécanismes clinico-pathologiques (Li et al., 2009 ; Duan et al., 2011; Krujif et al., 2012; Cho et al., 2014 ; Fang et al., 2014).

La surexpression de ces ligands a été considérée comme un indicateur tumoral chez les patients atteints de cancer de sein (Madjd et al., 2007).

A l'heure actuelle, les traitements des cancers de sang ont une efficacité limitée, c'est pourquoi les nouvelles stratégies s'orientent vers l'immunothérapie notamment en recherchant de nouvelles molécules pharmacologiques capables d'amplifier les réponses immunes anti tumorales.

Cibler l'expression des NKG2DL (NKG2D Ligands) paraît prometteuse pour mieux activer le système immunitaire et induire une élimination précoce des cellules cancéreuses.

Identifier des molécules qui peuvent surexprimer les ligands MICA/B et ULBP1 représente une approche thérapeutique intéressante.

Dans ce contexte, nous avons pu réaliser notre objectif principal puisque nous avons bien conclu que le DCA favorise l'expression des ligands MICA, MICB et ULBP1 et favorise la cytotoxicité des NK envers les cellules cancéreuses leucémiques. Nous avons vérifié cette hypothèse dans diverses lignées cellulaires, ainsi que dans des cellules issues de patients. Cependant cet effet n'est assuré que sur les lignées ayant une expression normale de p53. Dans ce sens, on a pu conclure que la perte ou la mutation des protéines p53 altère l'effet de DCA et donc on a pas les mêmes résultats souhaités (Hu et al., 2010; Sablina et al., 2005).

Bien que MICA/ et ULBP1 sont exprimés sur les cellules tumorales et leur formes membranaires participent à l'activation des cellules NK et à la costimulation des LT (Cerwenka et Lanier, 2003), leur forme soluble clivée par des MMP (ADAM-10, MMP14) est impliquée dans l'échappement tumoral (Chitadze et al., 2013). En effet, l'interaction entre MICA soluble et le récepteur NKG2D, qui est exprimé sur les cellules NK et les LT activés, entraîne l'internalisation du récepteur et sa dégradation. La littérature décrit que MICA possède différents niveaux de régulation : au niveau de sa transcription, de son transport à la membrane ou de son clivage en membrane et par l'implication d'un miRNA (Elsner et al., 2010; Fuertes et al., 2008; Yadav et al., 2009; Yang et al., 2014).

Lotefa Teiti et son équipe ont pu confirmer que RhoA ne régule pas l'expression de MICA et que les GTPases Ras, Rac1, RhoB et RhoC sont toutes des protéines régulatrices positives de l'expression membranaire de MICA. D'autre part ils ont confirmé que la voie de signalisation des MAPK (BRAF/MEK/ERK) régulent positivement le MICA.

D'autres équipes ont montré que l'expression des NKG2DL peuvent être modulée par divers autres voies de signalisations impliquant les protéines p38, NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  et mTOR (Acosta et al., 2008; Salama et al., 2014 ; Lasry et al., 2015).

Plus récemment Adi a confirmé que la voie ERK paraît responsable de la surexpression des ligands MICA/B et ULBP (**Stern-Ginossar et al., 2009 ; Wortzel et al., 2011; Adi et al., 2016**). Il a noté que l'activation de ERK par les protéines Grb2–SOS–Ras favorise la prolifération hiérarchique des cellules tumorales ce qui intervient probablement dans la diminution des ligands de stress facilitant l'échappement des cellules cancéreuses (**Pierre et al., 2011**).

D'autre part, le stress oxydatif induit lors de processus de tumorigénèse pourrait intervenir dans la régulation de l'expression des NKG2DL (**Yamamoto et al., 2001; Peraldi et al., 2009; Leticia et al., 2014**). Il a été démontré que le stress oxydatif induit l'expression des MICA/B et ULBP1 en cas de cancer de colon (**Yamamoto et al., 2001**) suite à l'activation de ERK5. Les conditions hypoxiques peuvent aussi intervenir dans la diminution de l'expression de MICA en cas d'ostéosarcome suite à l'activation de l'hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (**Yamada et al., 2012**).

Dans un autre contexte, certains gènes suppresseurs de tumeurs tel que le p53 peuvent aussi intervenir dans la régulation de l'activité des récepteurs NKG2D (**Leticia et al., 2014**). Plusieurs équipes s'intéressent à l'identification du rôle de p53 dans la régulation des réponses cellulaires induites par NKG2D. Notre équipe a pu confirmer que DCA stimule l'expression de p53 chez différents types cellulaires (**Allende-vega et al., 2015**) ainsi que les équipes de Textor et Li ont confirmé que la surexpression de p53 (wild-type p53) dans certaines lignées cancéreuses est fortement liée à l'augmentation de l'expression de ULBP1 et ULBP2 (**Textor et al., 2011; Li et al., 2011**).

D'autre part Heinemann a confirmé que la molécule Nutlin-3a peut inhiber l'expression de ULBP1 par la stimulation de miR-34. Cette régulation est p53 dépendante (**Heinemann et al., 2012**).

A cause de la variété des voies de signalisations activées, il nous paraît difficile de déterminer exactement lequel est responsable de la modification de l'expression protéiques de MICA, MICB et ULBP1 qui pourrait être p53 dépendant comme nous avons cité précédemment.



# CONCLUSION

Les transporteurs ABC ouvrent un champ d'investigation important dans le domaine de la pharmacocinétique des anticancéreux et dans la compréhension des mécanismes de chimiorésistance en cancérologie.

Leur rôle initial de détoxification de l'organisme a été détourné par les cellules tumorales pour se protéger contre les traitements chimiothérapeutiques d'où l'apparition des cellules chimio-résistantes qui représentent un des principales cause d'échecs des traitements anticancéreux. L'étude des protéines ABC qui sont impliquées dans ce phénomène représente alors un enjeu médical majeur et les résultats attendus devraient alors permettre une meilleure prise en charge thérapeutique des cancers chimiorésistants dont l'origine est corrélée à une surexpression des transporteurs ABC.

Le travail réalisé dans cette partie de thèse englobe deux approches complémentaires:

- \* Evaluer l'effet de DCA sur l'expression des transporteurs ABC
- \* Déterminer par quelle(s) voie(s) de signalisation le DCA agit sur l'expression des transporteurs ABC.

La première partie de ce travail de thèse se focalise sur l'approfondissement des études réalisées sur une nouvelle stratégie possible dans la lutte contre la chimiorésistance des cancers. Jusqu'à présent, les recherches menées sur la réversion du phénotype MDR se sont concentrées sur la recherche d'inhibiteurs de la fonction de transport de ces protéines. Les différentes études biologiques menées ont permis d'identifier que les quatre transporteurs étudiés (ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCG2) diminuent leurs expression en présence de DCA . Cette étude nous a permis d'observer que l'effet stimulant de DCA sur la chimiothérapie pourrait être du à son action limitant contre l'expression des ABC. Pour comprendre mieux le mode d'action de DCA sur les ABC on a essayé de vérifier l'implication de la voie de signalisation ERK5/NRF2 dans la diminution de l'expression des transporteurs. Nos résultats suggèrent que cette voie de signalisation pourrait être une cible thérapeutique pour limiter l'expression des ABC.

Ce travail devra alors être suivi par des tests sur des animaux plus poussés, afin de déterminer l'efficacité , la pharmacodynamique et cinétique, et aussi la possibilité de cibler des types cellulaires tumorales spécifiques, puisqu'il apparaît que l'effet de DCA est dépendant du type cellulaire. Cette nouvelle approche pourrait représenter une stratégie alternative moins contraignante pour le patient d'un point de vue des effets secondaires, et avec un meilleur ciblage des tumeurs chimiorésistantes. L'utilisation de dichloroacétate associé, soit avec la chimiothérapie, utilisée avec le daunorobucine, un médicament anticancéreux utilisé dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques et des

---

leucémies aiguës lymphoblastique, soit en immunothérapie utilisé en combinaison avec les cellules NK, représente une approche thérapeutique encourageante pour combattre le cancer.

Pour la deuxième partie de ma thèse, portant sur les mécanismes d'immunosurveillance et d'immunoévasion, nous nous sommes intéressés aux cellules NK. Nous avons émis l'hypothèse d'un rôle crucial des récepteurs activateurs des NK (NKG2D) dans l'établissement des mécanismes immunoévasifs des cellules tumorales. D'après les données de la littérature, nous avons choisi d'évaluer le rôle potentiel des ligands MICA/B et ULBP1 qui jouent un rôle important dans l'activation et la costimulation des cellules NK principalement par leur capacité de lier et d'activer le récepteur activateur NKG2D.

Le signal induit par l'interaction NKG2DL/NKG2D et sa dysfonction sont impliqués dans de nombreuses pathologies auto-immunes, dans le contrôle et l'échappement tumoral et le contrôle des réponses antivirales.

L'analyse de l'expression de ces ligands nous a permis de révéler que le DCA stimule l'expression de ces ligands. En effet, l'interaction des récepteurs NKG2D avec ces ligands renforce l'activation des NK. Par conséquent, les cellules présentant une forte expression des ligands de stress pourraient augmenter l'activité cytotoxique des NK.

Cibler ce mécanisme pourrait induire alors une neutralisation très importante des cellules cancéreuses et faire face aux mécanismes de l'évasion et d'échappement tumoral.



# **PERSPECTIVES**

Le cancer du sang représente un problème de santé public depuis plusieurs années, ce qui nécessite la découverte de nouvelles stratégies pour "soigner" les cancers et / ou améliorer la qualité de vie des patients atteints des cancers hématologiques.

Notre but principal était d'évaluer l'effet de DCA en combinaison soit avec l'immunothérapie à base des NK ou avec la chimiothérapie pour une élimination meilleure des cellules tumorales.

On a constaté que ces combinaisons sont avérées plus efficaces sur certains types cellulaires (wtp53) et non pas sur d'autre (nullp53, mutantp53) ce qui facilite le tri des patients qui pourraient bénéficier d'un tel traitement.

Nous essayerons de passer aux essais cliniques sur un modèle animal pour vérifier l'efficacité de DCA sur la réduction de l'expression des transporteurs ABC et donc sur la "correction" de la chimiorésistance. Il est indispensable de vérifier si l'efflux des agents anticancéreux par les transporteurs est vraiment dépendant de DCA *in vivo*.

Et d'autre part il est intéressant d'utiliser des molécules qui servent à bloquer la liaison des ligands de stress (ULBP1, MICA et MICB) avec leurs récepteurs NKG2D pour vérifier si l'augmentation de la cytotoxicité des NK face aux cellules tumorales est le résultat de l'interaction des NKG2L/NKG2D. Il est indispensable de vérifier si la voie de signalisation activée par DCA pour stimuler les NK passe vraiment par NKG2D.

Bien que plusieurs questions n'ont pas été résolues dans ce travail. Nous souhaitons continuer à évaluer la stratégie visant à éradiquer les cellules tumorales en induisant une activation continue et suffisante des cellules NK. Il reste, cependant, un aspect important dont il faut tenir compte car le nombre des cellules NK activées dans notre organisme n'est pas suffisant pour induire une élimination complète des cellules tumorales ce qui représente un problème majeur en clinique.

# **Références bibliographiques**

## A

- Abrar Ul Haq K, Moez G., Nerea Allende-V, Dang-Nghiem V, Sana Belkhala, Stefania Orecchioni, and Martin Villalba.** (2016). Human leukemic cells performing oxidative phosphorylation (OXPHOS) generate an antioxidant response independently of reactive oxygen species (ROS) generation. *EBioMedicine* pp 43-53, 11;3:4-5.
- Achanta G, Sasaki R, Feng L, et al.** (2005). Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J* ; 24 : 3482–3492.
- Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F** (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* ;133:1006–1018
- Aggarwal, S. and Pittenger, M. F.** (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-22
- Agnoletto, C., Melloni, E., Casciano, F., Rigolin, G.M., Rimondi, E., Celeghini, C., Brunelli, L., Cuneo, A., Secchiero, P., and Zauli, G.** (2014). Sodium dichloroacetate exhibits anti-leukemic activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and synergizes with the p53 activator Nutlin-3. *Oncotarget* 5, 4347–4360.
- Akbar Khan, Douglas Andrews, and Anneke C Blackburn** (2016). Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy *World J Clin Cases.* 2016 Oct 16; 4(10): 336–343.
- Allende-Vega, N., Sparks, A., Lane, D.P., and Saville, M.K.** (2010). MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a. *Oncogene* 29, 432–441.
- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G** (2009). "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding". *Science.* Science. 323 (5922): 1718–22. doi:10.1126/science.1168750. PMC 2720052. PMID 19325113
- Allez M et al** 2007. CD4+ NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology* 132:2346-2358;
- Ambudkar IS, Muallem S.** (2016). ROS in Ca(2+) signaling and disease-part 2. *Cell Calcium.* 2016 Sep;60(3):153-4. doi: 10.1016/j.ceca.2016.08.001.
- Anderson ME.** Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.* 1985;113:548-555.
- Anthony DA, Andrews D, Watt S, Trapani J, Smyth M** (2010). Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunol Rev.* May;235(1):73-92. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00907.x.
- Aptsiauri N, Jewett A, Hurwitz AA, Shurin MR, Umansky V.**(2016). Redefining cancer immunotherapy-optimization, personalization, and new predictive biomarkers: 4th Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring (CITIM) meeting, April 27-30, 2015, Ljubljana, Slovenia. *Cancer Immunol Immunother.* Jul;65(7):875-83. doi: 10.1007/s00262-016-1795-8.

**Ayyanathan, K., Kesaraju, S., Dawson-Scully, K., and Weissbach, H.** (2012). Combination of sulindac and dichloroacetate kills cancer cells via oxidative damage. *PloS One* 7, e39949.

## B

**Babu, E., Ramachandran, S., CoothanKandaswamy, V., Elangovan, S., Prasad, P.D., Ganapathy, V., and Thangaraju, M.** (2011). Role of SLC5A8, a plasma membrane transporter and a tumor suppressor, in the antitumor activity of dichloroacetate. *Oncogene* 30, 4026–4037.

**Bahram, S, Bresnahan M, Geraghty, Spies T.** (1994). A Second Lineage of Mammalian Major Histocompatibility Complex Class I Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(14): 6259–6263.

**Bajénoff M** .(2007). Lymphocyte migration in stromal cell networks *Med Sci (Paris)*. Apr;23(4):345-7.

**Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G.** 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-333.

**Banchereau, J., and Steinman, R.M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.

**Baragaño Raneros A, Minguela Puras A, Rodriguez RM, Colado E, Bernal T, Anguita E, Vasco Mogorron A, Chaparro Gil A, Jr VC, Márquez-Kisinousky L, Díaz Bulnes P, Martinez Marin A, García Garay MC, Suarez-Alvarez B, Lopez-Larrea C.** (2017). Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition. *Oncotarget*. Mar 29. doi: 10.18632/oncotarget.16657.

**Bartrons R, Caro J.** (2007). Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Jun;39(3):223-9.

Barao I, Alvarez M, Ames E, Orr M, Stefanski H, Blazar B, Lanier L, Anderson S, Redelman D, Murphy WJ .(2011). Mouse Ly49G2+ NK cells dominate early responses during both immune reconstitution and activation independently of MHC. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7032-41. doi: 10.1182/blood-2010-11-316653.

**Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Philips JH, Lanier LL, Spies T** (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729,.

**Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K** (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes.*;1461(2):217-236.

**Benedikt Feuerrecker, Christof Seidl, Sabine Pirsig, Gernot Bruchelt, and Reingard Senekowitsch-Schmidtke** (2015). DCA promotes progression of neuroblastoma tumors in nude mice *Am J Cancer Res.*; 5(2): 812–820.

**Benjamin Glaser** (1993-2005), Familial Hyperinsulinism In *GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (database online). Copyright, University of Washington, Seattle.

**Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal M, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E and Vousden K** (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolis and apoptosis. *Cell* 126, 107-120.

**Berger A, Lord C, Corey-Lisle PK, Williams GR, Oster G.**(2012).Utilization and cost in clinical practice of darbepoetin alfa and epoetin alfa for anemia concomitant with chemotherapy. Clin Ther. 2012 Jun;34(6):1350-63. doi: 10.1016/j.clinthera..04.020. Epub 2012 May 15.

**Besa Emmanuel C.** (2014, April 1). Myelodysplastic Syndrome Treatment & Management. WebMD LLC. Retrieved 09/12/2014. Extrait

**Betts, J.G., OpenStax College, and Rice University** (2013). Anatomy & physiology.

**Biedler, J.L. and H. Riehm**1970, Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. Cancer Res., 30(4): p. 1174-84. 35. Gutmann, H., et al., Transport of amentoflavone across the blood-brain barrier in vitro. Planta Med, 2002. 68(9): p. 804-7.

**Billadeau D, Faundez V.** (2015) .Neuronal and immune synapses on the move at traffic Mar;16(3):227-8. doi: 10.1111/tra.12251.

**Bisbal C, Martinand, Silhol M, Lebleu B and Salehzada T.** Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5A pathway. J Biol Chem, 1995. 270(22): p. 13308-17.

**Béziat V, Traherne J, Malmberg JA, Ivarsson MA, Björkström NK, Retière C, Ljunggren HG, Michaëlsson J, Trowsdale J, Malmberg KJ.**(2014). Tracing dynamic expansion of human NK-cell subsets by high-resolution analysis of KIR repertoires and cellular differentiation. Eur J Immunol. Jul;44(7):2192-6. doi: 10.1002/eji.201444464.

**Bloks V, Plösch T, Jonker J, Kuipers F .**(2015)."Impaired expression of multidrug resistance-associated protein 2 and liver damage in erythropoietic protoporphyria".Hepatology. 2016 May;63(5):1743-4. doi: 10.1002/hep.27993. Epub Aug 21.

**Bonnet, S., Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk,G.D., Puttagunta, L., Bonnet, S., et al.** (2007). A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. Cancer Cell 11, 37–51.

**Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR, Day BJ.**(2010).Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. J Biol Chem. 2010 May 28;285(22):16582-7. doi: 10.1074/jbc.M109.090506. Epub Mar 23.

**Brioschi PA, Horiot JC, Bernier J.,** (2012) « Radiothérapie intra-opératoire dans le traitement du cancer du sein : Quo Vadis? [Intraoperative radiation therapy in conservative treatment of breast cancer: , Rev Med Suisse, vol. 8, n° 342, , p. 1094-9 .

**Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Arrey F, Münz C**(2007).NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15Ralpha. J Clin Invest. Nov;117(11):3316-29.

**Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K., et al.,** Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet, 1999. 22(4): p. 336-45.

**Bryceson, Y.T.** (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. J. Exp. Med. 202, 1001–1012.

**Bryceson, Y.T., Ljunggren, H.-G., and Long, E.O.** (2009). Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. Blood 114, 2657–2666.

**Bryceson, Y.T., Chiang, S.C.C., Darmanin, S., Fauriat, C., Schlums, H., Theorell, J., and Wood, S.M.** (2011).Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *J. Innate Immun.* 3, 216–226.

**Burke, V. P., and Startzell, J. M.** (2008). The leukemias. *Oral Maxillofac Surg Clin NorthAm* 20, 597-608.).

**Buessow SC, Paul RD, Lopez DM** (1984). Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 73(1):249-255.

## C

**Cairns L** (2010) Micro RNAs and cancer *Ecancermedicalsecience.* Apr 30;4:ed6. doi: 10.3332/ecancer.2010.ed6. Collection 2010..

**Campoli M, Ferrone S.**(2011).HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition. *Semin Immunopathol.* 2011 Jul;33(4):321-34. doi: 10.1007/s00281-011-0270-z. Epub 2011.

**Candeil L, Gourdiere I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F, Orsetti B, Scheffer GL, Ychou M, Khan QA, Pommier Y, Pau B, Martineau P, Del Rio M** (2004).ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer.* 2004 May 10;109(6):848-54.

**Cao J, Xu J, Li W, Liu J.**(2008)Influence of selective brain cooling on the expression of ICAM-1 mRNA and infiltration of PMNLs and monocytes/macrophages in rats suffering from global brain ischemia/reperfusion injury. *Biosci Trends.* 2008 Dec;2(6):241-4.

**Carlsen, S.A., J.E. Till, and V. Ling,** Modulation of membrane drug permeability in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 1976. 455(3): p. 900-12.

**Cerboni, Cristina, Francesca N, Nicoletta C.** (2007).Human Immunodeficiency Virus 1 Nef Protein Downmodulates the Ligands of the Activating Receptor NKG2D and Inhibits Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *The Journal of General Virology* 88(Pt 1): 242–250.

**Cerboni, Cristina, Alessandra Z, Marco C.** (2007)Antigen-Activated Human T Lymphocytes Express Cell-Surface NKG2D Ligands via an ATM/ATR-Dependent Mechanism and Become Susceptible to Autologous NK- Cell Lysis. *Blood* 110(2): 606–615.

**Cerwenka, A, Bakker A,McClanahan T.** (2000).Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice. *Immunity* 12(6): 721–727.

**Cerwenka, A, Baron J, Lanier L.**(2001).Ectopic Expression of Retinoic Acid Early Inducible-1 Gene (RAE-1) Permits Natural Killer Cell-Mediated Rejection of a MHC Class I-Bearing Tumor in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(20): 11521–11526.

**Cerwenka, A, and Lanier L.**(2003).NKG2D Ligands: Unconventional MHC Class I-like Molecules Exploited by Viruses and Cancer. *Tissue Antigens* 61(5): 335–343.

- Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Philipps JH, Lanier LL**(2000). Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12:721-727,.
- Cesarini V, Martini M, Ricci Vitiani L, Luca Gravina G, Di Agostino S, Graziani G, Giorgio D'Alessandris Q, Pallini R, Larocca LM, Rossi P, Jannini EA, Dolci S.** (2017) *Oncotarget*. Type 5 phosphodiesterase regulates glioblastoma multiforme aggressiveness and clinical outcome. Jan 14. doi: 10.18632/oncotarget.14656.
- Chalupny, N. Jan, Annie Rein-Weston, Stephanie Dosch, and David Cosman** (2006). Down-Regulation of the NKG2D Ligand MICA by the Human Cytomegalovirus Glycoprotein UL142. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346(1): 175–181.
- Chalupny N, Rein-Weston A, Dosch S, Cosman D.** (2006). Down-regulation of the NKG2D ligand MICA by the human cytomegalovirus glycoprotein UL142. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jul 21;346(1):175-81. Epub 2006 May 24.
- Chan LM, Lowes S, Hirst BH** (2004). The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci*;21:25-51. 3. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58. 4. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007;446:749-57
- Chan CJ, Andrews DM, McLaughlin NM, Yagita H, Gilfillan S, Colonna M** (2010). DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol* ; **184**: 902–911.;
- Chan, A., Hong, D.-L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., and Bowness, P.** (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 89–94.
- Charni, S., Aguilo, J.I., Garaude, J., de Bettignies, G., Jacquet, C., Hipskind, R.A., Singer, D., Anel, A., and Villalba, M.** (2009). ERK5 knockdown generates mouse leukemia cells with low MHC class I levels that activate NK cells and block tumorigenesis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 3398–3405.
- Charni, S., de Bettignies, G., Rathore, M.G., Aguiló, J.I., van den Elsen, P.J., Haouzi, D., Hipskind, R.A., Enriquez, J.A., Sanchez-Beato, M., Pardo, J., et al.** (2010). Oxidative phosphorylation induces de novo expression of the MHC class I in tumor cells through the ERK5 pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185,3498–3503.
- Chauveau, A, Anne A, Philipp E, Eric V, and Daniel M.** (2010). Membrane Nanotubes Facilitate Long-Distance Interactions between Natural Killer Cells and Target Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(12): 5545–5550.
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB**(1986)..Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47(3): p. 381-9.
- Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z**(2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* ; **10**: 230–252.

- Chen, C.** (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179–e179.
- Chen Z, B Vulevic, KE Ile, A Soulika, W Davis.**(2004). Association of ABCA2 expression with determinants of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 2004. 18(10): p. 1129-31.
- Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quijcho FA.** A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell.* 2003;12(3):651-661
- Chen Z., Jinsheng D, Akihiko I, Ira D, Alan G.H and Michael D** (2006). The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem*, 281(11): p. 7452-7.
- Cheung H, Du J, Boehm J, He F, Weir B, Wang X, Butaney M, Sequist LV, Luo B, Engelman JA, Root DE, Meyerson M, Golub TR, Jänne PA, Hahn WC**(2011). Amplification of CRKL induces transformation and epidermal growth factor receptor inhibitor resistance in human non-small cell lung cancers. *Cancer Discov.* Dec;1(7):608-25. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0046. Epub 2011 Oct 17.
- Chipuk J.E, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin N., Newmeyer D., Schuler M. and Green D.**(2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303.1010-1014.
- Childers, G. Eckel, A. Himmel et J. Caldwell,** « A new model of cystic fibrosis pathology: lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. », *Med hypotheses*, vol. 68(1), 2015, p. 101-12
- Chiossone L, Conte R, Spaggiari GM, Serra M, Romei C, Bellora F, Becchetti F, Andaloro A, Moretta L, Bottino C.**(2016). Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Stem Cells.* Jul;34(7):1909-21. doi: 10.1002/stem.2369.
- Chretien AS, Le Roy A, Vey N, Prebet T, Blaise D, Fauriat C, Olive D.** Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 122.
- Cho H, Chung JY, Kim S, Braunschweig T, Kang TH, Kim J** (2014). MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 957.
- Classen CF, Falk CS, Friesen C, Fulda S, Herr I, Debatin KM**(2003). Natural killer resistance of a drug-resistant leukemia cell line, mediated by up-regulation of HLA class I expression. *Haematologica* ; 88: 509–521
- Codo P, Weller M, Meister G, Szabo E, Steinle A, Wolter M** (2014). MicroRNA-mediated down-regulation of NKG2D ligands contributes to glioma immune escape. *Oncotarget* 2014; 5: 7651–7662
- Consoli E, Arcangeli G, Ferrari V, Grisanti S, Almici C, Bordonali T, Simoncini E.**(2011). Circulating tumor cells and cardiac metastasis from esophageal cancer: a case report. *Case Rep Oncol.* 2011 May;4(2):299-303. doi: 10.1159/000329021. Epub 2011 May 28.
- Cooper, M.A., Fehniger T.A, and. Caligiuri M.A** (2001), The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 22(11): p. 633-40.].

**Cole S, Bhardwaj G, Gerlach J, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG.** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992;258(5088):1650-1654.

**Cordon-Cardo C, O'Brien J, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler J, Melamed M, Bertino J** (1989)Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jan;86(2):695-8.

**Crawford DH, Sweny P, Edwards JM, Janossy G, Hoffbrand AV** (1981).Long-term T-cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in renal-allograft recipients receiving cyclosporin A. *Lancet*. 1981 Jan 3;1(8210):10-2.

**Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ** (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123-133,

**Cynthia S. Collins,Stephen J. Gould**Identification of a common PEX1 mutation in Zellweger syndromeFirst published 1999 DOI: 10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<45::AID-HUMU6>3.0.CO;2-J

## D

**Dash, A. and Gilliland, D.G.** (2001) Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14, 49-64.

**Dauchy S., N. Tournier, S. Yousif, A. Jacob, X**(2008). Barrière hémato-encéphalique : implication des transporteurs ABC en neuropharmacologie Blood-brain barrier: Role of ABC transporters in neuropharmacology *Réanimation* 17, 664—669

**Dean, M.** (1998). Cancer as a complex developmental disorder--nineteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res*. 58, 5633–5636.

**Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets**(2001), The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*,. 11(7): p. 1156-66.

**Dean, M. and T. Annilo** (2005), Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet*,. 6: p. 123-42.

**Dean, M.,** (2009).ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,. 14(1): p. 3-9.

**DeBerardinis Rj ,Lum J. ,Hatzivassiliou G and thompson C** (2008).The biology of cancer:metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation .*Cell Metab* 7,11-20.

**Deeley RG, Westlake C, Cole SP** (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*;86:849—99).

**de Grouw EP, Raaijmakers MH, Boezeman JB, van der Reijden BA, van de Locht LT, de Witte TJ, Jansen JH, Raymakers RA.** (2006).Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38-cells.*Leukemia*. Apr;20(4):750-4.

- DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ.**(1979).Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 May;76(5):2420-4.
- Deleuze, J.F., et al.** (1996), Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology.*, 23(4): p. 904-8. 49
- Deniz, G., et al.,**( 2008).Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol.*,180(2): p. 850-7.]
- Dhar, S., and Lippard, S.J.** (2009). Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 22199–22204.
- Diefenbach, A, Jensen E , Jamieson A, and Raulet D.**(2001).Rae1 and H60 Ligands of the NKG2D Receptor Stimulate Tumour Immunity. *Nature* 413(6852): 165–171.
- Diefenbach, A., and D. H. Raulet.**(1999).Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune in. *Current Biology: CB* 9(22): R851–853.
- Dimlich RV, Kaplan J, Timerding BL, Van Ligten PF**(1989). Effects of various doses of sodium dichloroacetate on hyperlactatemia in fed ischemic rats. *Ann Emerg Med.* Nov;18(11):1162-71.
- Dippold WG, Jay G, DeLeo AB, Khoury G, Old LJ.**(1981) .p53 transformation-related protein detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Mar;78(3):1695-9
- Dienfach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH** (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.* 1:119-126,.
- Dmitriev, O.Y.** (2011), Mechanism of tumor resistance to cisplatin mediated by the copper transporter ATP7B. *Biochem Cell Biol.*, 89(2): p. 138-47.
- Domaica, C.I., Fuertes, M.B., Uriarte, I., Girart, M.V., Sardaños, J., Comas, D.I., Di Giovanni, D., Gaillard,M.I., Bezrodnik, L., and Zwirner, N.W.** (2012). Human natural killer cell maturation defect supports in vivo CD56(bright) to CD56(dim) lineage development. *PloS One* 7, e51677.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD**(2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*,3(11):991-998.
- Dupuy, S.** (2012).Human Herpesvirus 8 (HHV8) sequentially shapes the NK cell repertoire during the course of asymptomatic infection and Kaposi sarcoma. *PLoS Pathog.*, 8(1): p. e1002486.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD.** The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*2004, 21(2):137-148.
- Duan, Y., Zhao, X., Ren, W., Wang, X., Yu, K.-F., Li, D., Zhang, X., and Zhang, Q.** (2013). Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation. *OncoTargets Ther.* 6, 189–198.
- Duan X, Deng L, Chen X, Lu Y, Zhang Q, Zhang K** (2011).Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med Oncol* ; 28: 466–474.

E

**Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, et al.** (2010).IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *European journal of immunology*,40(12):3347-3357

**Escamilla-Tilch, M. et al.** (2013). The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer? *Immunol Cell Biol* 91, 601-610

F

**Fang L, Gong J, Wang Y, Liu R, Li Z, Wang Z** ( 2014).MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* ; **33**: 76.

**Farag, S.S., and Caligiuri, M.A.** (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 20,123–137.

**Fantin V, St-Pierre J, Leder P.**(2006)Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell.* 2006 Jun;9(6):425-34.

**Fauci A, Mavilio D, Kottlil S.**(2005).NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush.. *Nat Rev Immunol.* Nov;5(11):835-43

**Fehniger, T.A., Cai, S.F., Cao, X., Bredemeyer, A.J., Presti, R.M., French, A.R., and Ley, T.J.** (2007).Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* 26, 798–811.

**Fehniger, T.A., Wylie, T., Germino, E., Leong, J.W., Magrini, V.J., Koul, S., Keppel, C.R., Schneider, S.E.,Koboldt, D.C., Sullivan, R.P., et al.** (2010). Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res.* 20, 1590–1604.

**Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Münz, C.** (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 195, 343–351.

**Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., and Munz, C.** 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343-351.

**Fernández-Messina, Lola, Omodele Ashiru, Sonia Agüera-González, Hugh T. Reyburn, and Mar Valés-Gómez.**(2011).The Human NKG2D Ligand ULBP2 Can Be Expressed at the Cell Surface with or without a GPI Anchor and Both Forms Can Activate NK Cells. *Journal of Cell Science* 124(Pt 3): 321–327.

**Feuerecker, B., Pirsig, S., Seidl, C., Aichler, M., Feuchtinger, A., Bruchelt, G., and Senekowitsch-Schmidtke,R.** (2012). Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* 13, 1425–1435.

**Fiebiger, W., Olszewski, U., Ulsperger, E., Geissler, K., and Hamilton, G. (2011).** In vitro cytotoxicity of novel platinum-based drugs and dichloroacetate against lung carcinoid cell lines. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* 13, 43–49.

**Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouanguy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, Casanova JL.(2006).**Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol.* 2006 Dec;18(6):347-61. Epub 2006 Sep 25.

**Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouanguy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, Casanova JL.(2006).**Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol.* 2006 Dec;18(6):347-61. Epub 2006 Sep 25.

**Flavin R, Zadra G, Loda M (2011).**Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer. *J Pathol.* 2011 Jan;223(2):283-94. doi: 10.1002/path.2809. Epub 2010 Nov 16.

**Fojo A, Cornwell M, Cardarelli C, Clark DP, Richert N, Shen DW, Ueda K, Willingham M, Gottesman MM, Pastan I.(1987).**Molecular biology of drug resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 1987;9(1):5-16.

**Freud G., Yu J., and Caligiuri, M.A (2014).** Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin. Immunol.* 26, 132–137.

**Fu Z., and Tindall D. (2008) .**FOXOs cancer and regulation of apoptosis.*Oncogene* 27,2312-2319.

**Fujiwara S, Kawano Y, Yuki H, Okuno Y, Nosaka K, Mitsuya H, and Hata H. (2013).** PDK1 inhibition is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Br. J. Cancer* 108, 170–178.

## G

**Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. (2015).**Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell.* Dec 14;28(6):690-714. doi: 10.1016/j.ccell.2015.10.012.

**Gameiro M, Silva R, Rocha-Pereira C, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Remião F.(2017).**Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules.* 2017 Apr 8;22(4). pii: E600. doi: 10.3390/molecules22040600.

**Gerosa F, Baldani-Guerra B, Lyakh LA, Batoni G, Esin S, Winkler-Pickett RT, Consolaro MR, De Marchi M, Giachino D, Robbiano A, Astegiano M, Sambataro A, Kastelein RA, Carra G, Trinchieri G. (2008).**Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med.* 2008 Jun 9;205(6):1447-61. doi: 10.1084/jem.20071450. Epub May 19.

**Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G.(2005).** The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions.*J Immunol.* Jan 15;174(2):727-34.

**Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novaul S, Escudier B, Vivier E (2005).** CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* 202, 1075–1085.

- Gilfillan, S, Emily L. Ho, Marina C, Wayne M. Yokoyama, and Marco C.**(2002a).NKG2D Recruits Two Distinct Adapters to Trigger NK Cell Activation and Costimulation. *Nature Immunology* 3(12): 1150–1155.
- Gilfillan, S, Emily L. Ho, Marina C, Wayne M. Yokoyama, and Marco C** (2002b).NKG2D Recruits Two Distinct Adapters to Trigger NK Cell Activation and Costimulation. *Nature Immunology* 3(12): 1150–1155.
- Gogvadze,V.Zhinotovskiy B and Orrenius S** (2010).The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells.*Mol Aspect Med* 31,60-74
- Gordan JD.Thompson C.B and Simon M.** (2007).HIF and c-Myc:sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation.*Cancer Cell* 12,108-113.
- Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I** (1995). Genetic Analysis of the Multidrug Transporter. *Annu. Rev. Genet.*;29(1):607-649.
- Gottesman M, Ambudkar S** (2001). Overview: ABC Transporters and Human Disease. *J. Bioenerg. Biomembr.*;33(6):453-458.
- Gong, F., Peng, X., Sang, Y., Qiu, M., Luo, C., He, Z., Zhao, X., and Tong, A.** (2013). Dichloroacetate induces protective autophagy in LoVo cells: involvement of cathepsin D/thioredoxin-like protein 1 and Akt-mTOR-mediated signaling. *Cell Death Dis.* 4, e913.
- Gopinath Sutendra and Evangelos** (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front. Oncol.*, 07 March.
- Granzin M, Wagner J, Köhl U, Cerwenka A, Huppert V, Ullrich E** (2017).*Front Immunol.* 2017 Apr 26;8:458. doi: 10.3389/fimmu.2017.00458. eCollection 2017. Review.
- Gregory E. Conner, Corinne Wijkstrom-Frei, Scott H. Randell, Vania E. Fernandez et Matthias Salathe,** (2007)« The Lactoperoxidase System Links Anion Transport To Host Defense in Cystic Fibrosis », *FEBS Lett.*, vol. 581, n° 2, 23 janvier, p. 271-278.
- Groh, V., Bahram, S. Bauer.**(1996).Cell Stress-Regulated Human Major Histocompatibility Complex Class I Gene Expressed in Gastrointestinal Epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(22): 12445–12450.
- Groh, Veronika, Anja Bruhl, Hani El-Gabalawy, J. Lee Nelson, and Thomas S.**(2003).Stimulation of T Cell Autoreactivity by Anomalous Expression of NKG2D and Its MIC Ligands in Rheumatoid Arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(16): 9452–9457.
- Groh, Veronika, Jennifer Wu, Cassian Yee, and Thomas Spies.**(2002).Tumour-Derived Soluble MIC Ligands Impair Expression of NKG2D and T-Cell Activation. *Nature* 419(6908): 734–738.
- Guerra, N, Ying X, Nathalie T. Joncker.**(2008).NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* 28(4): 571–580.

H

- Hahm, E.-R., Karlsson, A.I., Bonner, M.Y., Arbiser, J.L., and Singh, S.V.** (2014). Honokiol inhibits androgen receptor activity in prostate cancer cells. *The Prostate* 74, 408–420.
- Hahm E, Sakao K, Singh SV.**(2014).Honokiol activates reactive oxygen species-mediated cytoprotective autophagy in human prostate cancer cells. *Prostate*. 2014 Sep;74(12):1209-21. doi: 10.1002/pros.22837.
- Hallett W, Ames E, Alvarez M, Barao I, Taylor PA, Blaza BR, Murphy WJ.**(2008). Combination therapy using IL-2 and anti-CD25 results in augmented natural killer cell-mediated antitumor responses. *Biol Blood Marrow Transplant*. Oct;14(10):1088-99. doi: 10.1016/j.bbmt.2008.08.001.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanberry, B.S., Berger, R., and Zastre, J.A.** (2014). High-dose vitamin B1 reduces proliferation in cancer cell lines analogous to dichloroacetate. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 73, 585–594.
- Hanberry B, Berger R, Zastre J.**(2014).High-dose vitamin B1 reduces proliferation in cancer cell lines analogous to dichloroacetate. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Mar;73(3):585-94. doi: 10.1007/s00280-014-2386-z. Epub 2014 Jan 23.
- Han D, Rodriguez-Bravo V, Charytonowicz E, Demicco E, Domingo-Domenech J, Maki RG, Cordon-Cardo C.**(2017).Targeting sarcoma tumor-initiating cells through differentiation therapy. *Stem Cell Res*. 2017 Apr 13;21:117-123. doi: 10.1016/j.scr.2017.04.004.
- Harlow E, Williamson NM, Ralston R, Helfman DM, Adams TE.** (1985). Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol Cell Biol*. Jul;5(7):1601-10.
- HAS.2013:** Haute Autorité de Santé (HAS). Pertinence du développement de la chimiothérapie en Hospitalisation à Domicile : analyse économique et organisationnelle.
- Haugrud AB, Zhuang Y, Coppock JD, Miskimins WK** (2014).Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Oct;147(3):539-50. doi: 10.1007/s10549-014-3128-y. Epub 2014 Sep 12.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G.**(2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2, 28.
- He, M., Rosen, J., Mangiameli, D., and Libutti, S.K.** (2007). Cancer development and progression. *Adv. Exp.Med. Biol.* 593, 117–133.
- Heinemann A, Zhao F, Pechlivanis S, Eberle J, Steinle A, Diederichs S** (2012). Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res* 72(2):460–7110.1158/0008-5472.CAN-11-1977 .

- Hendricks DW et al. 2014; Beziat V (2014) ; Fausther-Bovendo H et al. 2008 ; Oliviero B et al. 2009; Björkström NK et al. 2011**
- Hengartner, H. (1994).** Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31–37.
- Higgins, C.F. (1992),** ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.*, 8: p. 67-113.
- Higgins CF, Linton KJ (2004).** The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct. Mol. Biol.*;11(10):918-926.
- Hirsh H.,Iliopoulos D.,Tsihchlis P.N and Struhl K., (2009).**Metformin selectively targets cancer stem cells and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission .*Cancer Res* 69,7507-751
- Hopfner KP (2016)** Architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins *Biopolymers.* 2016 Aug;105(8):492-504. doi: 10.1002/bip.22843.
- Hornig T ( 2007).** NKG2D signaling is coupled to the interleukin-15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol* 8:1345-1352
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., Altekruse, S., Kosary, C., Yu, M., Ruhl, J.,Tatalivich, Z., et al. (2013).** SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda,MD.
- Hsia CC, Lazo-Langner A.(2012).**Acute nonlymphocytic leukemia presenting with pancytopenia. *Blood.* 2012 Feb 9;119(6):1333.
- Hsu P and Sabatini D (2008).**Cancer cell metabolism:Warburg and beyond.*Cell*134,703-707.
- Hu D, Ren Y, Zhu K, Lv Y, Cheng H, Zhang Z, Li Y, He SM, Tang J, Liu JL, Lin Y, Sun YY, Zuo XB, Chen G, Sun LD, Yang S, Zhang XJ (2011).**Comparisons of clinical features of HLA-DRB1\*07 positive and negative vitiligo patients in Chinese Han population. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 Nov;25(11):1299-303. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03971.x. Epub 2011 Jan 17
- Hur, H., Xuan, Y., Kim, Y.B., Lee, G., Shim, W., Yun, J., Ham, I.-H., and Han, S.-U. (2013).** Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. *Int. J. Oncol.* 42, 44–54.
- Huber, Laura Haynes, Chris Parker, Peter Iversen(2012),** « Interdisciplinary Critique of Sipuleucel-T as Immunotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer », *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 104, n° 4, 22 février, p. 273-279.
- Huntington, N.D., Xu, Y., Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2005).** A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *J. Exp. Med.* 201, 1421–1433.

**Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al.** (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 25–34.

**Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, López-Soto A, Villa-Álvarez M, Gonzalez-Rodriguez AP, Gonzalez S.**(2014). Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. *Front Immunol.* 2014 Mar 21;5:106. doi: 10.3389/fimmu.2014.00106.

## I

**IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans** (2009)., « Evaluations Globales de la Cancérogénicité pour l'Homme, Groupe 2B : Peut-être cancérogènes pour l'homme sur <http://monographs.iarc.fr> [archive], CIRC, 16 janvier Consulté le 22 août 2009.

**Ide T, Brown-Endres L, Chu K, et al.** (2009)GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress. *Mol Cell* ; 36 : 379–392.

**Institut National du Cancer (INCa)** (2014). Les types de chirurgie et leurs buts [en ligne]. [consulté le 27 avr]. Disponible: <http://www.e-cancer.fr/cancerinfo/se-fairesoigner/traitements/chirurgie/types-et-objectifs> 15. Bergerat JP. Onco-hématologie. Thoiry: Heures de France; 1996. 495 p.

**Institut National du Cancer (INCa)**. Comprendre la radiothérapie. BoulogneBillancourt: Institut national du cancer; 2009. 106 p. 20. Morère JF, Bouillet T, Crépin M. Le cancer pour les nuls. Paris: First éd.; 2011. 295 p.

**INCa.2016**.Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015 /États des lieux et enjeux, appui à la décision, juillet 2016.

**Irons, R. D., and Stillman, W. S.** (1996). The process of leukemogenesis. *Environmental health perspectives* 104 Suppl 6, 1239-1246.).

**Ishiguro T, Kashima K, Yachida N, Motoyama T, Enomoto T.** (2017). Recurrent ovarian undifferentiated carcinoma resembling hepatoid morphology treated with pegylated liposomal doxorubicin and bevacizumab. *J Obstet Gynaecol Res.* Apr 19. doi: 10.1111/jog.13298.

## J

**Jamieson, Amanda M., Andreas Diefenbach, Christopher W. McMahon.**(2002)The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing. *Immunity* 17(1): 19–29.

**Jansen RS, Mahakena S, de Haas M, Borst P, van de Wetering K** (2015).ATP-binding Cassette Subfamily C Member 5 (ABCC5) Functions as an Efflux Transporter of Glutamate Conjugates and Analogs.. (*J Biol Chem.* Dec 18;290(51):30429-40. doi: 10.1074/jbc.M115.692103. Epub 2015 Oct 29.

**Jason A. Bush and Gang LI** (2002)Cancer chemoresistance: The relationship between p53 and multidrug transporters.Int. J. Cancer: 98, 323–330 (2002).

**Jason Y.Y. Wong, Gordon S. Huggins, Marcella Debidida, Nikhil C. Munshi, and Immaculata De Vivo** (2008).Dichloroacetate Induces Apoptosis in Endometrial Cancer CellsGynecol Oncol. Jun; 109(3): 394–402.

**Jeannin P, Duluc D, Delneste Y**(2011). IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFN-gamma. Immunotherapy, 3(4 Suppl):23-26.

**Jiaying Shen<sup>1,6</sup>, Jie Pan<sup>1,6</sup>, Chengyong Du<sup>2</sup>, Wengong Si<sup>1</sup>, Minya Yao<sup>2</sup>, Liang Xu<sup>1,3</sup>, Huilin Zheng<sup>1</sup>, Mingjie Xu<sup>1</sup>, Danni Chen<sup>1</sup>, Shu Wang<sup>4</sup>, Peifen Fu<sup>2</sup> and Weimin Fan<sup>1</sup>**Citation (2017) Silencing NKG2D ligand-targeting miRNAs enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity in breast cancer. Cell Death and Disease **8**, e2740;doi:10.1038/cddis.2017.158.Published online April 2017.

**Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N** (2003). Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. Int. J. Cancer 104:354- 361,.

**Johnstone, T.C., Kulak, N., Pridgen, E.M., Farokhzad, O.C., Langer, R., and Lippard, S.J.** (2013). Nanoparticle encapsulation of mitaplatin and the effect thereof on in vivo properties. ACS Nano 7, 5675–5683.

**Juelke, K., Killig, M., Luetke-Eversloh, M., Parente, E., Gruen, J., Morandi, B., Ferlazzo, G., Thiel, A.,Schmitt-Knosalla, I., and Romagnani, C.** (2010). CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. Blood 116, 1299–1307.

**Juelke K, Romagnani C.** (2015).Differentiation of human innate lymphoid cells (ILCs). Curr Opin Immunol. 2016 Feb;38:75-85. doi: 10.1016/j.coi.2015.11.005. Epub Dec 17.

**Julian LJ, Vella L, Frankel D, Minden SL, Oksenberg JR, Mohr DC.**(2009).ApoE alleles, depression and positive affect in multiple sclerosis. Mult Scler. Mar;15(3):311-5. doi: 10.1177/1352458508099478.

**Juliano, R.L. and V. Ling** (1976), A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta,. 455(1): p. 152-62.

## K

**Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Kaminski, S., Adjali, O., Jacquet, C., Garaude, J., Keriel, A., Lassaux, A., Hipskind, R., Sitbon, M., Taylor, N.,and Villalba, M.** (2012). The protooncogene Vav1 regulates murine leukemia virus-induced T-cell leukemogenesis. Oncoimmunology 1, 600–608.

**Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH** (2007).Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. Nature ; 447: 482–486.

**Kankotia, S., and Stacpoole, P.W.** (2014). Dichloroacetate and Cancer: New Home for an Orphan Drug.Biochim. Biophys. Acta.

**Kärre, K.** (2008). Natural killer cell recognition of missing self. Nat. Immunol. 9, 477–480.

- Kaur B khwaja F W,Severson E.A .Matheny S ,Brat D and Van Meir G (2005).**Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis.Neuro Oncol 7,134-153.
- Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, et al (2008).** p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF- $\kappa$ B pathway and inhibits cell transformation. Nat Cell Biol ; 10 : 611–618.
- Kieckbusch J, Gaynor LM, Moffett A, Colucci F. (2017).**MHC-dependent inhibition of uterine NK cells impedes fetal growth and decidual vascular remodeling.. Nat Commun. Apr 20;8:15444. doi: 10.1038/ncomms15444.
- Kim J.W. Tchemyshyov I Semenza G and Dang C (2006).**HIF-1 -mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase:metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.Cell Metab 3,177-185.
- Klein C, Waldhauer I, Nicolini VG, Freimoser-Grundschober A, Nayak T, Vugts DJ, Dunn C, Bolijn M, Benz J, Stihle M, Lang S, Roemmele M, Hofer T<sup>1</sup>, van Puijenbroek E, Wittig D, Moser S, Ast O, Brünker P, Gorr IH, Neumann S, de Vera Mudry MC, Hinton H, Cramer F, Saro J, Evers S, Gerdes C, Bacac M, van Dongen G, Moessner E, Umaña P.(2017).**Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. Oncoimmunology. Jan 11;6(3):e1277306. doi: 10.1080/2162402X.2016.1277306. eCollection 2017.
- Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS.(1994).** P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. Blood. May 1;83(9):2451-8
- Kluza, J., Corazao-Rozas, P., Touil, Y., Jendoubi, M., Maire, C., Guerreschi, P., Jonneaux, A., Ballot, C.,Balayssac, S., Valable, S., et al. (2012).** Inactivation of the HIF-1 $\alpha$ /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants.Cancer Res. 72, 5035–5047.
- Kloss M, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee H--G, et al (2008).** Interaction of monocytes with NK cells upon Toll--like receptor--induced expression of the NKG2D ligand MICA. J Immunol Baltim Md 1950 ;1
- Knudson AG Jr (2013).** My memories of Dr. Giovanni Neri. Am J Med Genet A. 2013 Nov;161A(11):2706. doi: 0.1002/ajmg.a.36268.
- Kroemer G and Pouyssegur J (2008).**Tumor cell metabolism:cancer's achilles hell.Cancer cell.13.472-782.
- Krishnamurthy P, Schuetz JD (2006).**Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine.Annu Rev Pharmacol Toxicol. ;46:381-410.
- Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E (2014).**Natural cytotoxicity receptors and their ligands. Immunol Cell Biol. Mar;92(3):221-9. doi: 10.1038/icb.2013.98. Epub 2013 Dec 24.
- Kruijff EM, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA (2012).**NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. BMC Cancer 2012; 12: 24.

**Kumar, A., Kant, S., and Singh, S.M.** (2012). Novel molecular mechanisms of antitumor action of dichloroacetate against T cell lymphoma: Implication of altered glucose metabolism, pH homeostasis and cell survival regulation. *Chem. Biol. Interact.* 199, 29–37.

**Kumar, A., Kant, S., and Singh, S.M.** (2013a). Antitumor and chemosensitizing action of dichloroacetate implicates modulation of tumor microenvironment: a role of reorganized glucose metabolism, cell survival regulation and macrophage differentiation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273, 196–208.

**Kumar, K., Wigfield, S., Gee, H.E., Devlin, C.M., Singleton, D., Li, J.-L., Buffa, F., Huffman, M., Sinn, A.L., Silver, J., et al.** (2013b). Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 749–758.

**Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y.** (2006) Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells. *J Reprod Immunol.* Jun;70(1-2):33-42. Epub 2006 Feb 20.

**Kwitniewski, M., Moan, J., and Juzeniene, A.** (2011). Metabolic-targeted therapy with dichloroacetate (DCA): a novel treatment strategy to improve the outcome of photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 10, 25–28.

## L

**Lane D, Crawford L** (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* Mar 15;278(5701):261-3.

**Lanier et al. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer Adelheid Cerwenka & Lewis L.. Nature Reviews Immunology 1, 41-49 (October) doi:10.1038/35095564.**

**Lanier L, Chang C, Azuma M, Ruitenberg J, Hemperly J, and Phillips H. (1991). Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). J. Immunol. Baltim. Md 1950 146, 4421–4426.**

**Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger (1991) NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3).. Blood. Mar 1;77(5):1080-6.**

**Lasry A, Ben-Neriah Y (2015). Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. Trends Immunol. ;36:217–228**

**Lechat P (2006). Médicaments utilisés en chimiothérapie anticancéreuse [consulté le 1 mai 2014]. Disponible: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/POLY.Chp.20.2.3.html>**

**Leichtnam-Dugarin L, Vennin P. Institut National du Cancer (INCa) (2011). Comprendre la chimiothérapie. Boulogne-Billancourt: Institut national du cancer;. 127 p.**

**Lerner BH, (2009) Complicated lessons: Lorenzo Odone and medical miracles. Lancet; ;73:888-889**

- L'Esperance, S** (2006).Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors. *Int J Oncol.*, 29(1): p. 5-24.
- Li H, Lakshmikanth T, Garofalo C, Enge M, Spinnler C, Anichini A** (2011). Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2. *Cell Cycle* ,10(19):3346–5810.4161/cc.10.19.17630
- Li, H.W., and Sykes, M.** (2012). Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 403–416
- Li K, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Suzuki A, Yagi H** (2009). Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunol Immunother* ; **58**: 641–652.
- Lin, G., Hill, D.K., Andrejeva, G., Boulton, J.K.R., Troy, H., Fong, A.-C.L.F.W.T., Orton, M.R., Panek, R., Parkes, H.G., Jafar, M., et al.** (2014). Dichloroacetate induces autophagy in colorectal cancer cells and tumours. *Br.J. Cancer* 111, 375–385.
- Lin, G., Hill, D.K., Andrejeva, G., Boulton, J.K.R., Troy, H., Fong, A.-C.L.F.W.T., Orton, M.R., Panek, R., Parkes, H.G., Jafar, M., et al.** (2014). Dichloroacetate induces autophagy in colorectal cancer cells and tumours. *Br. J. Cancer* 111, 375–385.
- Linton KJ, Higgins CF**(2007).Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch.* Feb;453(5):555-67. Epub 2006 Aug 26.
- Linzer DI, Maltzman W, Levine AJ** (1979). The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology.* Oct 30;98(2):308-18
- Liu, H., Rich, E.S., Godley, L., Odenike, O., Joseph, L., Marino, S., Kline, J., Nguyen, V., Cunningham, J., Larson, R.A., et al.** (2011). Reduced-intensity conditioning with combined haploidentical and cord blood transplantation results in rapid engraftment, low GVHD, and durable remissions. *Blood* 118, 6438–6445.
- Liu C, Yu S, Kappes J, Wang J, Grizzle WE, Zinn KR, et al.** (2007).Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood*, 109(10):4336-4342
- Liu, W., Su, J., Jiang, J., Li, X., Ye, Q., Zhou, H., Chen, J., and Li, Y.** (2013). Two mixed-NH<sub>3</sub>/amine platinum (II) anticancer complexes featuring a dichloroacetate moiety in the leaving group. *Sci. Rep.* 3, 2464.**Liu, X., Wang, Y., Sun, Q., Yan, J., Huang, J., Zhu, S., and Yu, J.** (2012). Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. *Immunol. Lett.* 143, 208–217.
- Livingston P, Zhang S, Adluri S, Yao TJ, Graeber L, Ragupathi G, et al.** (2006) Tumor cell reactivity mediated by IgM antibodies in sera from melanoma patients vaccinated with GM2 ganglioside covalently linked to KLH is increased by IgG antibodies. *Cancer immunology, immunotherapy : CeI*1997, 43(6):324-330.)Freud A.G. et Caligiuri M.A.,

**Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. (2007).** Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 329–339.

**Lodoen M, Ogasawara K, Hamerman JA, Arase H, Houchins JP, Mocarski ES, Lanier LL, Higgins CF.(2003).** Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med.* 2003 May 19;197(10):1245-53.

**Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. (2005).**Rescue of folding defects in ABC transporters using pharmacological chaperones. *J Bioenerg Biomembr.* Dec;37(6):501-7.

**Lu J, Manjusri D, Suman K,.(2014).**Induction of ATM/ATR Pathway Combined with V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells Enhances Cytotoxicity of Ovarian Cancer Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1842(7): 1071–1079.

**Lum J, Schnepfle D, Nie Z, Sanchez-Dardon J, Mbisa GL, Mihowich J, Hawley N, Narayan S, Kim JE, Lynch DH, Badley AD(2004).**Differential effects of interleukin-7 and interleukin-15 on NK cell anti-human immunodeficiency virus activity. *J Virol.* Jun;78(11):6033-42

**Luo L, Zhengyu L, Weidong W.(2014).**Role of MICA Antibodies in Solid Organ Transplantation. *Clinical Transplantation* 28(2): 152–160.

## M

**Mace, S. (2005).**ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.*, 18(1): p. 119-25.

**Mace, Emily M., Prachi D, Hsiang T.(2014).**Cell Biological Steps and Checkpoints in Accessing NK Cell Cytotoxicity. *Immunology and Cell Biology* 92(3): 245–255.

Madjd Z, Spendlove I, Moss R, Bevin S, Pinder SE, Watson NF (2007). Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immun* ;

**Madhok B, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA, Jayne DG.(2010).**Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer.* 2010 Jun 8;102(12):1746-52. doi: 10.1038/sj.bjc.6605701. Epub May 18.

**Maher S, Sipos P, Maher S, Szabóné RP, Eros I.( 2007).**Liberation of active substance from pharmaceutical suspensions I. Effect of surfactants on the active substance dissolving]. *Acta Pharm Hung.* ;77(2):142-9.

**Mallinson JE, Constantin-Teodosiu D, Graves PD, Martin EA, Davies WJ, Westwood FR, Sidaway JE, Greenhaff PL (2012).**Pharmacological activation of the pyruvate dehydrogenase complex reduces statin-mediated upregulation of FOXO gene targets and protects against statin myopathy in rodents. *J Physiol.* 15;590(24):6389-402.

**Matoba S(2006).** p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* ; 312 : 1650–1653.

**Mathupala SP, Heese C, Pedersen PL(1997).** Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem*; 272 : 22776–22780.

**Michelakis, E.D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., Maguire, C., Gammer, T.-L., Mackey, J.R., Fulton, D., et al.** (2010). Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci.Transl. Med.* 2, 31ra34.

**Michelakis, E.D., Webster, L., and Mackey, J.R.** (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolictargeting therapy for cancer. *Br. J. Cancer* 99, 989–994.

**Misbin R** (1979).Effects of dichloroacetate on lipid metabolism in isolated rat liver cells. *Diabetes.* Apr;28(4):265-71.

**Morère JF, Bouillet T, Crépin M** (2011). *Le cancer pour les nuls*. Paris: First éd.; 295 p.

**Morère JF, Viguiier J, Touboul C, Pivot X, Blay JY, Coscas Y, Lhomel C, Eisinger F.** (2015). Lung cancer risks, beliefs and healthcare access among the underprivileged. *Eur J Cancer Prev.* Jun;24 Suppl:S82-6. doi: 10.1097/CEJ.000000000000143.

**Morita M, Motoki K, Akimoto K, Natori T, Sakai T, Sawa E** (1995).Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem,* 38(12):2176-2187

**Muller, P.A.J., and Vousden, K.H.** (2013). p53 mutations in cancer. *Nat. Cell Biol.* 15, 2–8.

**Morfouace, M., Lalier, L., Bahut, M., Bonnamain, V., Naveilhan, P., Guette, C., Oliver, L., Gueguen, N,Reynier, P., and Vallette, F.M.** (2012). Comparison of spheroids formed by rat glioma stem cells and neural stem cells reveals differences in glucose metabolism and promising therapeutic applications. *J. Biol.Chem.* 287, 33664–33674.

**Mo.Zhang A, Zhou N, Huang J, Liu Q, Fukuda K, Ma D, Lu Z, Bai C** (2013). K, Mo YY.The human long non-coding RNA-RoR is a p53 repressor in response to DNA damage.*Cell Res.* 2013 Mar;23(3):340-50. doi: 10.1038/cr.2012.164. Epub 2012 Dec 4.

**Molinero Luciana L, Mercedes B , María Victoria G** (2004).NF-Kappa B Regulates Expression of the MHC Class I-Related Chain A Gene in Activated T Lymphocytes. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 173(9): 5583–5590.

**Molinero, Luciana Lorena, Carolina Inés Domaica, Mercedes Beatriz F.** (2006).Intracellular Expression of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity. *Human Immunology* 67(3): 170–182.

**Montaldo, E., Zotto, G.D., Chiesa, M.D., Mingari, M.C., Moretta, A., Maria, A.D., and Moretta, L.** (2013).Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function: Human NK Cell Receptors/Markers. *Cytometry A* 83A, 702–713.

**Mosser, J., et al.,** (1993).Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature.*, 361(6414): p. 726-30.

**Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser J, Beer-Stolz D and Vujanovic N** (2012). Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 1:1074-1083.

## N

**Nakagawa R, Serizawa I, Motoki K, Sato M, Ueno H, Iijima R, et al.** (2000) Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. *Oncol Res*, 12(2):51-58.

**Nakamura, Kyohei, Masafumi Nakayama, Mitsuko Kawano.**(2013).Fratricide of Natural Killer Cells Dressed with Tumor-Derived NKG2D Ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(23): 9421–9426

**Nausch N,Galani IE, Schlecker E, Cerwenka A**(2008). Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood* , 112(10):4080-4089.

**Nakano K. and Vousden K.** (2001).PUMA? A novel proapoptotic gene , is induced by p53.*Mol Cell* 7,683-694.

**Nedvetzki, S, Stefanie S, Robert A. Eagle.**(2007).Reciprocal Regulation of Human Natural Killer Cells and Macrophages Associated with Distinct Immune Synapses. *Blood* 109(9): 3776–3785.

**Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vély F, Pende D, et al** (2007). Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* ;109:]

**Nguyen K, Salazar-Mather T, Dalod M, Van Deusen J, Wei X, Liew F, Caligiuri M, Durbin J, Biron C.** (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection.*J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4279-87.

**Nies A, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D**(2004). Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience.*;129(2):349-360.**Nieto M. et al., 1998**

**Niewisch, M.R., Kuçi, Z., Wolburg, H., Sautter, M., Krampen, L., Deubzer, B., Handgretinger, R., and Bruchelt, G.** (2012). Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy? *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp.Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 29, 373–380.

**Nitahara, A, Hideki S, Akiko I.**(2006).NKG2D Ligation without T Cell Receptor Engagement Triggers Both Cytotoxicity and Cytokine Production in Dendritic Epidermal T Cells. *The Journal of Investigative Dermatology* 126(5): 1052–1058.

## O

**Ogasawara, K, Jessica A Hamerman, Lauren R, Ehrlich.**(2004).NKG2D Blockade Prevents Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Immunity* 20(6): 757–767.

**Ohashi, T., Akazawa, T., Aoki, M., Kuze, B., Mizuta, K., Ito, Y., and Inoue, N.** (2013). Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 133, 1107–1118.

**Orange, Jordan S., Narayanaswamy Ramesh, Eileen Remold-O'Donnell.**( 2002).Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Is Required for NK Cell Cytotoxicity and Colocalizes with Actin to NK Cell-Activating Immunologic Synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(17): 11351–11356.

## P

**Pandey, Rahul, Christine M. DeStephan, Lisa A. Madge, Michael J. May, and Jordan S. Orange.**(2007).NKp30 Ligation Induces Rapid Activation of the Canonical NF-kappaB Pathway in NK Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179(11): 7385–7396

**Pariante Ballez M.** (2011).Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4+ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* Jul;141(1):217-26, 226.e1-2. doi: 10.1053/j.gastro.2011.03.061. Epub 2011 Apr 7.

**Park, J.M., Recht, L.D., Josan, S., Merchant, M., Jang, T., Yen, Y.-F., Hurd, R.E., Spielman, D.M., and Mayer,D.** (2013). Metabolic response of glioma to dichloroacetate measured in vivo by hyperpolarized (13)C magnetic resonance spectroscopic imaging. *Neuro-Oncol.* 15, 433–441.

**Park, J.M., Recht, L.D., Josan, S., Merchant, M., Jang, T., Yen, Y.-F., Hurd, R.E., Spielman, D.M., and Mayer,D.** (2013). Metabolic response of glioma to dichloroacetate measured in vivo by hyperpolarized (13)C magnetic resonance spectroscopic imaging. *Neuro-Oncol.* 15, 433–441.

**Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G.M., Marcenaro, S., Dondero, A., Lazzeri, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P., et al.** (2006). Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107:2030-2036.

**Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N** (2009) . Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *J Immunol* 182(3):1696–705

**Pierre S, Bats AS, Coumoul X** (2011). Understanding SOS (Son of Sevenless). *Biochem Pharmacol.*;9:1049–1056

**Pfister C, Rouprêt M, Wallerand H, Davin J-L, Quintens H, Guy L, et al. : Recommandations du Comité de cancérologie de l'Association française d'urologie (AFU)** (2010): Recommandations en oncurologie 2010 : Tumeurs urothéliales. *Prog Urol* ; 20(Suppl. 4) : S255–74

**Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., and Zimmer, J.** (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126, 458–465.

## R

**Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC**(2009), « Multiple myeloma » *Lancet* ;374:324-339.

**Rabinovich B, Ketchem R, Wolfson M, Goldstein L, Skelly M, Cosman D** (2008). A role for the MHC class I-like Mill molecules in nutrient metabolism and wound healing. *Immunol Cell Biol.* 2008 Aug-Sep;86(6):489-96. doi: 10.1038/icb.2008.41. Epub Jun 17.

**Radosavljevic M, Benoît C, Michael J. Wilson.**(2002).A Cluster of Ten Novel MHC Class I Related Genes on Human Chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 79(1): 114–123.

**Randazzo M, Terness P, Opelz G, Kleist C**(2012). Activespecific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. *Int J Cancer*;130: 2219-31.

**Raulet D.** (2015).Bone Marrow Cell Rejection, MHC, NK Cells, and Missing Self Recognition: Ain't That Peculiar (with Apologies to Marvin Gaye). *J Immunol.* Oct 1;195(7):2923-5. doi: 10.4049/jimmunol.1501804.

**Riordan, J.R.,** et al., Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, 1985. 316(6031): p. 817-9

**Ritter, C.A.,** et al. (2005), Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev.,* 37(1): p. 253-78.

**Roger G. Deeley, Christopher Westlake, Susan P. C**(2006). *Cole Physiological Reviews* Published 1 July Vol. 86 no. 3, 849-899 DOI: 10.1152/physrev.00035.2005.

**Roger T, Schneider A, Weier M, Sweep FC, Le Roy D, Bernhagen J, Calandra T, Giannoni E.**(2016).High expression levels of macrophage migration inhibitory factor sustain the innate immune responses of neonates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Feb 23;113(8):E997-1005. doi: 10.1073/pnas.1514018113. Epub Feb 8.

**Robey, I.F., and Martin, N.K.** (2011). Bicarbonate and dichloroacetate: evaluating pH altering therapies in a mouse model for metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 11, 235.

**Rust, S** (1999).Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*, 22(4): p. 352-5.

## S

**Sablina A, Budanov A, Ilyinskaya G, Agapova L, Kravchenko J, Chumakov PM'**(2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 2005 Dec;11(12):1306-13. Epub Nov 13.

**Shafi S** (2011). An NKG2D-mediated human lymphoid stress-surveillance response with high interindividual variation. *Sci Transl Med* 2011 3:113ra124.

**Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M.**(2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*;28:99–114.

**Sanchez, W.Y., McGee, S.L., Connor, T., Mottram, B., Wilkinson, A., Whitehead, J.P., Vuckovic, S., and Catley, L.** (2013). Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. *Br. J. Cancer* 108, 1624–1633.

**Sang Ho Ra et al.**, « A Case of Sustained Cholestasis Caused by Acute A Viral Hepatitis in Dubin-Johnson Syndrome », *Korean Journal of Gastroenterology*, vol. 59, n° 4, avril 2012, p. 313-316.

**Sara Altmeyer, Jürgen Zentek, Wilfried Vahjen, Lydia Scharek-Tedin** (2017). The expression of NKG2D on porcine IEL and its possible relation to the adaptive intestinal immune system. *Cell Immunol.* Apr 18. pii: S0008-8749(17)30051-5. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.04.004

**Schatton T, Frank MH.** (2008). Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* Feb;21(1):39-55. doi: 10.1111/j.1755-148X.2007.00427.x.

**Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ.**(2011) .Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024):1565-1570

**Schrambach S, Marc A, Vincent L, Jean S, Seiamak B.**(2007).In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PloS One* 2(6): e518.

**Schreiber AL, Norbury JW, De Sousa EA.**(2011).Functional recovery of untreated human immunodeficiency virus-associated Guillain-Barré syndrome: a case report. *Ann Phys Rehabil Med.* Nov;54(8):519-24. doi: 10.1016/j.rehab.2011.09.009. Epub 2011 Oct 11

**Schuieler, M.M. and T. Langmann,** Molecular diagnosis of ATP-binding cassette transporter-related diseases. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005. 5(5): p. 755-67.

**Schulz U, Kreutz M, Multhoff G, Stoelcker B, Köhler M, AndresenR, et al.** (2010) Interleukin-10 promotes NK cell killing of autologous macrophages by stimulating expression of NKG2D ligands. *Scand J Immunol* ;72:319–31

**Schulze B, Piehler D, Eschke M, Heyen L, Protschka M, Köhler G, Alber G.**(2016).Therapeutic expansion of CD4+FoxP3+ regulatory T cells limits allergic airway inflammation during pulmonary fungal infection. *Pathog Dis.* 2016 Jun;74(4):ftw020. doi: 10.1093/femspd/ftw020. Epub 2016 Mar 21.

**Schwartzberg-Bar-Yoseph F**(2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* ; 64 : 2627–633.

**Schwinn N, Daria V, Antje S** (2009).Interferon-Gamma down-Regulates NKG2D Ligand Expression and Impairs the NKG2D-Mediated Cytolysis of MHC Class I-Deficient Melanoma by Natural Killer Cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 124(7): 1594–1604

**Scott D, Davidson JA.** (2011).Managing chronic kidney disease in type 2 diabetes in family practice. *J Natl Med Assoc.* Sep-Oct;103(9-10):952-9.

**Scoville S, Freud A, Caligiuri M**(2017).Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol.* 2017 Mar 27;8:360. doi: 10.3389/fimmu..00360.

- Semenza, G.L.** (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20, 51-56.
- Sergey S., Lawrence M. Noguee, M.D., Tarmo Annilo, Dsan E. Wert, Jeffrey A. Whitsett, and Michael Dean** (2004), ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.*, 350(13): p. 1296-303.
- Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H.** (1995). Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14):6254-6258.
- Serrano A., Menares- E C, Garrido-T, Carolina H., Carolina J H, Ariadna M, Marcela G, Rodrigo V** (2011). Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunol Cell Biol.*, 89(3): p. 447-57.
- Siemens D, Heaton J, Adams M, Kawakami J, Graham CH.** (2009). Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer. *Urology*. 2009 Oct;74(4):878-83. doi: 10.1016/j.urology.2009.03.004. Epub May 24.
- Simhadri VR, Dimitrova M, Mariano J, Zenarruzabeitia O, Zhong W, Ozawa T, Muraguchi A, Kishi H, Eichelberger MC, Borrego F** (2015). A Human Anti-M2 Antibody Mediates Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) and Cytokine Secretion by Resting and Cytokine-Preactivated Natural Killer (NK) Cells. *PLoS One*. 2015 Apr 27;10(4):e0124677. doi: 10.1371/journal.pone.0124677. eCollection.
- Singh, N.** (2016) Molecular Modelling of Human Multidrug Resistance Protein 5 (ABCC5). *Journal of Biophysical Chemistry*, 7, 61-73. <http://dx.doi.org/10.4236/jbpc.2016.73006>
- Sharom, F.J.** (1997), The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol.*, 160(3): p. 161-75.
- Shani, N. and D. Valle** (1998), Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol.*, 292: p. 753- 76.
- Shahrzad, S., Lacombe, K., Adamcic, U., Minhas, K., and Coomber, B.L.** (2010). Sodium dichloroacetate (DCA) reduces apoptosis in colorectal tumor hypoxia. *Cancer Lett.* 297, 75–83.
- Shilling, R.A., et al.**, New light on multidrug binding by an ATP-binding-cassette transporter. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(4): p. 195-203.
- Singh, N.** (2016) Molecular Modelling of Human Multidrug Resistance Protein 5 (ABCC5). *Journal of Biophysical Chemistry*, 7, 61-73.73006, 7, 61-73
- Smyth, M.J., Teng, M.W.L., Swann, J., Kyparissoudis, K., Godfrey, D.I., and Hayakawa, Y.** (2006). CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J. Immunol. Baltim.Md* 1950 176, 1582–1587.
- Smith, J. D., V. M. Brunner, S. Jigjidsuren.** (2009). Lack of Effect of MICA Antibodies on Graft Survival Following Heart Transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9(8): 1912–1919.
- Smyth MJ, Jeremy S, Erika C., et al.** 2005 NKG2D Function Protects the Host from Tumor Initiation. *The Journal of Experimental Medicine* 202(5): 583–588

**Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Karuntu-Wanamarta AH, Verstraeten AA, Livingston PO, Hilgers J, et al.** (2001). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*,93(1):97-106

**Société canadienne du cancer.** Types de chimiothérapie [en ligne]. 2015 [consulté le 1 mai 2014]. Disponible: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/chemotherapy-and-other-drug-therapies/chemotherapy/types-of-chemotherapy>

**Sorokina, L.V., Pyatchanina, T.V., Didenko, G.V., Kaplia, A.A., and Khyzhnyak, S.V.** (2011). The influence of sodium dichloroacetate on the oxidative processes in sarcoma 37. *Exp. Oncol.* 33, 216–221.

**Spaggiari, G.M., Carosio, R., Pende, D., Marcenaro, S., Rivera, P., Zocchi, M.R., Moretta, L., and Poggi, A.** (2001). NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol* 31:1656-1665..)

**Stacpoole P, Kurtz T, Han Z, Langaee T.** (2008). Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* Oct-Nov;60(13-14):1478-87. doi: 10.1016/j.addr.2008.02.014. Epub 2008 Jul 4.

**Stander, X.X., Stander, B.A., and Joubert, A.M.** (2011). In vitro effects of an in silico-modelled 17 $\beta$ -estradiol derivative in combination with dichloroacetic acid on MCF-7 and MCF-12A cells. *Cell Prolif.* 44, 567

**Stefkova, J., R. Poledne, and J.A. Hubacek,** ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, 2004. 53(3): p. 235-43.

**Stern-Ginossar N** (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* 9:1065-1073; Tili E, Michaille JJ, Croce CM. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol Rev* 2013; 253: 167–184

**Stern-Ginossar N, Mandelboim O** (2009). An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology.* ;128:1–6.

**Strautnieks S, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB** (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet.* 20(3): p. 233-8.

**Stroncek, D.F., Melief, C.J., Castiello, L., Cesano, A., Cheever, M.A., Civini, S., Comin-Anduix, B., Gajewski, T.F., Greenberg, P.D., Kalinski, P., et al.** (2013). Highlights of the society for immunotherapy of cancer (SITC) 27th annual meeting. *J. Immunother. Cancer* 1.

**Strid, Jessica, Scott J. Roberts, Renata B. Filler.**(2008). et al. Acute Upregulation of an NKG2D Ligand Promotes Rapid Reorganization of a Local Immune Compartment with Pleiotropic Effects on Carcinogenesis. *Nature Immunology* 9(2): 146–154.

**Sun, W., Zhou, S., Chang, S.S., McFate, T., Verma, A., and Califano, J.A.** (2009). Mitochondrial mutations contribute to HIF1 $\alpha$  accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 476–484. (Saed et al., 2011).

**Sun, R.C., Board, P.G., and Blackburn, A.C.** (2011). Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells. *Mol. Cancer* 10, 142. (Sutendra et al., 2013).

**Sun, R.C., Fadia, M., Dahlstrom, J.E., Parish, C.R., Board, P.G., and Blackburn, A.C.** (2010). Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res. Treat.* 120, 253–260.

**Sutendra, G., and Michelakis, E.D.** (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front. Oncol.* 3.

**Sutendra, G., Dromparis, P., Kinnaird, A., Stenson, T.H., Haromy, A., Parker, J.M.R., McMurtry, M.S., and Michelakis, E.D.** (2013). Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer. *Oncogene* 32, 1638–1650.

**Szakács G, Jill K., Joseph A. Ludwig, Catherine B.G and Michael M. G**(2006), Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5(3): p. 219-34.

## T

**Terabe M, Berzofsky JA.** (2007) NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol*, 28(11):491-496.

**Tieng V ( 2002 )** . Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2977-2982.

**Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A** (2011) . Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res* 71(18):5998–6009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3211

## U

**Une, C., Andersson, J., and Orn, A.** (2003). Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 195–201.

**Unni AM, Bondar T, Medzhitov R** (2008). Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* ; **105**: 1686–1691.

## V

**Valés-Gómez M** (2015). The Impact of Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anchored MICA Alleles on Novel NKG2D-Based Therapies. *Front Immunol*; 6: 193. Published online 2015 Apr 27. doi: 10.3389/fimmu.2015.00193.

**Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B.** (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

**van Kuijk, M. Kool, G.F. Merks, A. Geurts van Kessel, R.J. Bindels, P.M. Deen, C.H.** (1997), « Assignment of the canalicular multispecific organic anion transporter gene (CMOAT) to human

chromosome 10q24 and mouse chromosome 19D2 by fluorescent in situ hybridization », *Cytogenetics and cell genetics*, vol. 77, n° 3-4, , p. 285-287 .

**Vega-Naredo, I., Loureiro, R., Mesquita, K.A., Barbosa, I.A., Tavares, L.C., Branco, A.F., Erickson, J.R., Holy,J., Perkins, E.L., Carvalho, R.A., et al.** (2014). Mitochondrial metabolism directs stemness and differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells. *Cell Death Differ.*)

**Vella, S., Conti, M., Tasso, R., Cancedda, R., and Pagano, A.** (2012). Dichloroacetate inhibits neuroblastoma growth by specifically acting against malignant undifferentiated cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 130,1484–1493.

**Vella, S., Conti, M., Tasso, R., Cancedda, R., and Pagano, A.** (2012). Dichloroacetate inhibits neuroblastoma growth by specifically acting against malignant undifferentiated cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 130,1484–1493.

**Verneris MR, Karimi M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS** (2004). Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood* ; **103**: 3065–3072.

**Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P., and Altman, A.** (2000). A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* 12, 151–160.

**Villalba, M., Rathore, M.G., Lopez-Royuela, N., Krzywinska, E., Garaude, J., and Allende-Vega, N.** (2013).From tumor cell metabolism to tumor immune escape. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 106–113.

**Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S.** (2008). Functions of natural killer cells. *Nat.Immunol.* 9, 503–510.

**Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini,S.** (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 331, 44–49.

**Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L.** (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 239–252.

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431.

**Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, Tepper RI, et al.** (1998).Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *The Journal of experimental medicine*, 188(6):1039-1046

**Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O., Eric T,Julien T and Magali T.**(2006), Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 70. -article2  
Kamiyama, M., et al., EP2, a receptor for PGE2, regulates tumor angiogenesis through direct effects on endothelial cell motility and survival. *Oncogene.* 25(53): p. 7019-28

**Voron T, Marcheteau E, Pernot S, Colussi O,Julien T. and Magali T.** (2014), Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front. Oncol.*, 4: p. 70.

W

- Waldmann TA** (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* Mar;9(3):269- 77.
- Waldmann, T.A., and Tagaya, Y.** (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu. Rev.Immunol.* 17, 19–49.
- Walker, E.J. and J.W. Dow** (1982), Location and properties of two isoenzymes of cardiac adenylate kinase. *Biochem J.*, 203(2): p. 361-9.
- Wallace, M.E., and Smyth, M.J.** (2005). The role of natural killer cells in tumor control--effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 27, 49–64.
- Wang, L. M., A. Kimura, M. Satoh, and S. Mineshita** (1999).HLA Linked with Leprosy in Southern China: HLA-Linked Resistance Alleles to Leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases: Official Organ of the International Leprosy Association* 67(4): 403–408.
- Warburg, O.** (1930). Warburg report on the metabolism of tumors. *J. Chem. Educ.* 7, 179.
- Warburg, O.** (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314.
- Wei Mo and Jian-Ting Zhang** (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol.*; 3(1): 1–27.Published online 2011 Mar 30.PMCID: PMC3325772 .
- Wilson S, Zhu T, Khanna R, Pritz MB.**(2011).Quantitative RT-PCR analyses of five evolutionary conserved genes in alligator brains during developement. *Transl Neurosci.* Dec;2(4):339-343.
- Wink M, Ashour ML, El-Readi MZ.**(2012).Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents. *Front Microbiol.* 2012 Apr 23;3:130. doi: 10.3389/fmicb.2012.00130. eCollection 2012.
- Wong, J.Y.Y., Huggins, G.S., Debidda, M., Munshi, N.C., and De Vivo, I.** (2008). Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 109, 394–402.
- Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol* 2015; **33**: 445–474.
- Wortzel I, Seger R** (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & cancer.* 1;2:195–209 ;
- Wu, C.-A., Chao, Y., Shiah, S.-G., and Lin, W.-W.** (2013). Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1147–1156.

**Wu, Jennifer, Veronika G,Thomas Spies.**(2002).xT Cell Antigen Receptor Engagement and Specificity in the Recognition of Stress-Inducible MHC Class I-Related Chains by Human Epithelial  $\gamma\delta$  T Cells: 1236–1240.

## X

**Xiao, L., Li, X., Niu, N., Qian, J., Xie, G., and Wang, Y.** (2010). Dichloroacetate (DCA) enhances tumor cell death in combination with oncolytic adenovirus armed with MDA-7/IL-24. *Mol. Cell. Biochem.* 340, 31–40.

**Xiang Zhou, Ruohua Chen, Zhenhai Yu, Rui Li, Jiajin Li, Xiaoping Zhao, Shaoli Song, Jianjun Liu, and Gang Huang** (2015).Dichloroacetate restores drug sensitivity in paclitaxel-resistant cells by inducing citric acid accumulation.*Mol Cancer.* 2015; 14: 63.

**Xie, J., Wang, B.-S., Yu, D.-H., Lu, Q., Ma, J., Qi, H., Fang, C., and Chen, H.-Z.** (2011). Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells. *Int. J. Oncol.* 38, 409–417.

Xie J, Liu M, Li Y, Nie Y, Mi Q, Zhao S. Ovarian tumor-associated microRNA-20a decreases natural killer cell cytotoxicity by downregulating MICA/B expression. *Cell Mol Immunol* 2014; **11**: 495–502.),

**Xu X, Zhang J, Zhan S, Li Z, Liu X, Zhang H, Jiang Y, Hu X** (2017).TGF- $\beta$ 1 improving abnormal pregnancy outcomes induced by *Toxoplasma gondii* infection: Regulating NKG2D/DAP10 and killer subset of decidual NK cells. *Cell Immunol.* Apr 18. pii: S0008-8749(17)30051-5. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.04.004.

**Xuan, Y., Hur, H., Ham, I.-H., Yun, J., Lee, J.-Y., Shim, W., Kim, Y.B., Lee, G., Han, S.-U., and Cho, Y.K.** (2014).Dichloroacetate attenuates hypoxia-induced resistance to 5-fluorouracil in gastric cancer through the regulation of glucose metabolism. *Exp. Cell Res.* 321, 219–230.

**Xue, X., You, S., Zhang, Q., Wu, Y., Zou, G., Wang, P.C., Zhao, Y., Xu, Y., Jia, L., Zhang, X., et al.** (2012).Mitaplatin Increases Sensitivity of Tumor Cells to Cisplatin by Inducing Mitochondrial Dysfunction. *Mol. Pharm.* 9, 634–644.

## Y

**Yamada N, Yamanegi K, Ohyama H, Hata M, Nakasho K, Futani H** (2012). Hypoxia downregulates the expression of cell surface MICA without increasing soluble MICA in osteosarcoma cells in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner. *Int J Oncol* 41(6):2005–1210.3892/ijo.2012.1630.

**Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H**(2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in a human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 1526:10–210.1016/S0304-4165(01)00099-X.

**Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H** (2001) . Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in a human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 1526:10–210.1016/S0304-4165(01)00099-X.

**Yang, Y., Shang, P., Cheng, C., Wang, D., Yang, P., Zhang, F., Li, T., Lu, A., and Zhao, Y.** (2010). Novel Nphenyl dichloroacetamide derivatives as anticancer reagents: design, synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 4300–4306.

**Ye J, Kaattari I, Ma C, Kaattari S.** (2013).The teleost humoral immune response. *Fish Shellfish Immunol.* Dec;35(6):1719-28.

**Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, et al.** (2003).P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* ; 63 : 3729–3734.

**Yu, J., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A.** (2013). Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* 34, 573–582.

**Young MR, Newby M, Wepsic HT**(1987). Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research*, 47(1):100-105.

## Z

**Zhang F, Zhang W, Liu L, Fisher CL, Hui D, Childs S, Dorovini-Zis K, Ling V.** (2000), Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes. *J Biol Chem*, 275(30): p. 23287-94.

**Zhang, N., and Palmer, A.F.** (2011). Development of a dichloroacetic acid-hemoglobin conjugate as a potential targeted anti-cancer therapeutic. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1413–1420.

**Zhang S, Yang X, Morris ME** (2004). Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport. *Mol. Pharmacol.*;65(5):1208-1216.

**Zhang, C, Jian Z, Rui S.**(2005).Opposing Effect of IFNgamma and IFNalpha on Expression of NKG2 Receptors: Negative Regulation of IFNgamma on NK Cells. *International Immunopharmacology* 5(6): 1057–1067.

**Zhang, Qiuheng, J. Michael C, David W. Gjertsonl.**(2011).HLA and MICA: Targets of Antibody-Mediated Rejection in Heart Transplantation. *Transplantation* 91(10): 1153–1158.

**Zhao, Jie, Yi Jiang, Yuan L.**(2011).Functional MICA-129 Polymorphism and Serum Levels of Soluble MICA Are Correlated with Ulcerative Colitis in Chinese Patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26(3): 593–598.

**Zheng, M.-F., Shen, S., and Huang, W.** (2013). DCA increases the antitumor effects of capecitabine in a mouse B16 melanoma allograft and a human non-small cell lung cancer A549 xenograft. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72, 1031–1041.

**Zhou, G., Wang, J., Zhao, M., Xie, T.-X., Tanaka, N., Sano, D., Patel, A.A., Ward, A.M., Sandulache, V.C., Jasser, S.A., et al.** (2014). Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation. *Mol. Cell* 54, 960–974.

**Zimmerman1 C, Kevin C. K, Patti K., Aalok R. Singh, Bonnie L. Firestein, Shannyn C. Riba & Jaisri R. Lingappa (2002).** Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV- 1 capsids. *Nature*, 415(6867): p. 88-92.

**Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G(2006).** Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews Immunology*,6(10):715-727

**Zwicker, F., Kirsner, A., Peschke, P., Roeder, F., Debus, J., Huber, P.E., and Weber, K.J. (2013).**Dichloroacetate induces tumor-specific radiosensitivity in vitro but attenuates radiation-induced tumor growth delay in vivo. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgenges. A1* 189, 684–692.

**Zwirner, N. W., K. Dole. Stastny P.(1999).**Differential Surface Expression of MICA by Endothelial Cells