



HAL
open science

Les mécanismes moléculaires de la méthionine dépendance des cellules souches cancéreuses

Racha Zgheib

► **To cite this version:**

Racha Zgheib. Les mécanismes moléculaires de la méthionine dépendance des cellules souches cancéreuses. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0342 . tel-01835090

HAL Id: tel-01835090

<https://theses.hal.science/tel-01835090>

Submitted on 11 Jul 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.

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par

Racha Zgheib

**Les mécanismes moléculaires de la méthionine dépendance des
cellules souches cancéreuses**

Le 20 Décembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme Claire Lafrasse Rodriguez : PU-PH, UFR Faculté de médecine Lyon Sud, EA3738 CTO

M. Jean-Noel Freund : Dr, UMR U682 INSERM, Strasbourg

Examineurs : M. Jean-Louis Guéant : PU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy

M. Dominique Porquet : PU-PH, UFR Pharmacie, Université Paris Sud

Mme Shyue-Fang Battaglia-Hsu : MCU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy

M. Bernard Namour : PU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy **Directeur de thèse**

Invités : M. Jean Yves Jouzeau : PU-PH, UMR 7365 CNRS, Université de Lorraine

Mme Christelle Clément Duchene: PH, institut de cancérologie de Lorraine

UMR 954 Inserm, Laboratoire de Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux, 9
avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Tout d'abord je tiens à remercier Monsieur **le Professeur Jean-Louis Guéant**, directeur de l'Unité Inserm U954 NGERE, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein de son laboratoire. À travers ses compétences, ses recommandations, ses vastes connaissances, et surtout ses tests amusants sur le métabolisme, il m'a transmis le plaisir de la recherche. Veuillez trouver, en ce témoignage, ma profonde gratitude et mon admiration.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Monsieur **le Professeur Bernard Namour** pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse. Par son soutien au quotidien, sa disponibilité, ses précieux conseils et sa patience, il m'a permis de réaliser ce travail et de surmonter les différentes épreuves de mon doctorat. Je n'arriverai jamais à décrire complètement ma gratitude envers lui. Vous êtes d'une humanité exceptionnelle, je vous aime beaucoup et j'avais la chance d'être votre étudiante!

Madame Shyue-Fang Battaglia-Hsu! Quoi vous dire ! Je ne pourrai jamais vous remercier suffisamment ! Vous m'avez sauvée durant ma deuxième année de thèse ! Mille Mercis pour tout tout! Pour vos conseils, votre temps que vous m'avez consacré, vos idées scientifiques qui ne se terminent jamais, votre enthousiasme pour la recherche, votre bonne humeur...votre cœur !

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'être les membres de mon jury, je tiens à remercier **Monsieur Jean Noel Freund** et **Madame le Professeur Claire Lafrasse-Rodriguez**. Je les remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et je remercie également **Madame Christelle Clement Duchene**, **M. le Professeur Jean Yves Jouzeau** et **M. le Professeur Dominique Porquet** d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je tiens aussi à remercier profondément **Sébastien Hergalent**, ingénieur bioinformaticien de notre laboratoire, pour les analyses du RNA-seq et du méthylome et pour la bioinformatique. Merci pour toutes les discussions enrichissantes, pour ton soutien et ta sympathie, tout au long de cette thèse.

Je remercie les ingénieurs **Jean-Marc Alberto** et **Céline Chéry** pour leurs aides, leurs conseils et leur disponibilité. Merci beaucoup !

Je tiens aussi à remercier chaleureusement **Aline Cazé** pour son sourire permanent, son soutien et sa tendresse maternelle.

Un grand merci aux secrétaires **Dominique et Catherine** pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur patience.

Merci à tous mes amis du laboratoire (anciens et nouveaux) **Fereshteh, Amélia, Aurélie, Sophie, Déborah, Justine, les Jeremys (numéro 1 et numéro 2 :P), Rémy, Viola, Lynda, Rashka, Zhen, Lu, Coralie, Pauline et Tunay**, pour tous les bons moments passés ensemble et leur bonne humeur !

Je remercie de tout mon coeur mes compatriotes, mes amis que j'ai rencontrés à l'Unité, **Rose, Christine, Hassan et Zeinab**, pour les moments inoubliables que j'ai vécus avec eux à Nancy. Vous m'avez facilité la vie loin de notre pays ! Merci !

Ayouye, ma meilleure amie depuis mon enfance, merci pour ton encouragement et ton écoute ! I love you ajrouchi!

Ma famille **Maman, papa, Ramroum, Dodi, et Samo** ! Vous êtes mon bonheur ! Les mots ne pourront jamais exprimer combien je suis reconnaissante envers vous. Sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible. Merci pour votre patience, votre soutien, votre confiance et surtout votre amour. Je vous aime !

Néna, ma grand-mère, mon amour, je suis enfin «daktoura » mais tu n'es plus là! J'ai toujours mal au cœur, c'était trop tard...je suis désolée!

Ali! L'homme de ma vie ! Ouf shou b7ebak ! Merci d'être toujours là pour moi ! Merci d'être dans ma vie ! Nous sommes en train de vivre un rêve qui ne finira jamais ! Je t'aime du fond fond de mon cœur !

À ma mère...

Publications:

Racha Zgheib, Shyue-Fang Battaglia, Sébastien Hergalant, Jean-Louis Guéant, Fares Namour “Methyl-tetrahydrofolate rescues the proliferation of methionine-deprived glioblastoma cancer stem cell” (en cours de préparation).

Rania Elakoum*, **Racha Zgheib***; Rose Ghemrawi, Hassan Melhem, Jérémie Raso, Nadir Mrabet, Shyue-Fang Battaglia, Natacha Dreumont, Laurnt Peyrin-Biroulet, Jean-Louis Guéant, Fares Namour “CARM1 and PRMT1 do not heterodimerize despite a predicted interface similar to that found in each protein homodimer.” (prête pour la soumission).

Communications orales:

Racha Zgheib*, Shyue-Fang Battaglia*, Sébastien Hergalant, Jean-Louis Guéant, Fares Namour “Why Cancer Stem Cells are methionine dependent?” 11th international conference One carbon metabolism and Homocystein. Aarhus, Denmark 2017.

Racha Zgheib*, Shyue-Fang Battaglia*, Sébastien Hergalant, Jean-Louis Guéant, Fares Namour “Why Cancer Stem Cells are methionine dependent?” Journée de l'école doctorale Biose, Nancy, 2017.

Communications affichées:

R Zgheib, R Elakoum, S Lorentz, JL Guéant and F Namour (2015) “Consequence of methylgroup deficiency on Carm1 and Prmt1 functions” journée scientifique de l'école doctorale Biose-Nancy France

Table des matières

Liste des figures	14
Abréviations	18
Préambule	24
Les mécanismes moléculaires de la méthionine dépendance des cellules souches cancéreuses	26
Introduction	28
1. Les cellules souches	30
1.1. Définition des cellules souches	30
1.2. Cellules souches et facteurs de transcription.	30
1.3. Cellules souches pluripotentes induites (CSPi).....	31
1.4. Cellules souches et cancer.....	31
1.5. L'hypothèse des cellules souches cancéreuses (CSC).....	32
1.5.1. <i>Exploration historique des 2 modèles de l'origine du cancer : stochastique et hiérarchique</i> .	36
1.5.1.1. L'étude des tératocarcinomes	37
1.5.1.2. L'étude des hépatocarcinomes.....	38
1.5.1.3. L'étude des leucémies myéloïdes de l'homme et première identification des cellules souches cancéreuses	39
1.5.1.4. Identification de cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes	40
1.5.2. <i>La cellule souche cancéreuse responsable de la formation de la tumeur</i>	40
1.5.2.1. Les propriétés communes avec la cellule souche normale	40
1.5.2.2. Les propriétés spécifiques de la cellule souche cancéreuse	40
1.5.3. <i>Les voies de signalisation de l'auto-renouvellement des cellules souches</i>	41
1.5.3.1. BMI-1	41
1.5.3.2. Wnt/B-caténine	41
1.5.3.3. Notch	41
1.5.3.4. Jun-B	41
1.5.3.5. Sonic hedgehog	42
1.5.3.6. Les voies NF-KB et PI-3 kinase	42
1.5.4. <i>Niches des cellules souches cancéreuses</i>	42
1.5.5. <i>Méthodes d'isolement des cellules souches normales et cancéreuses</i>	42
1.5.5.1. La méthode Side Population (SP)	42
1.5.5.2. Méthodes de marqueurs de surface	43
1.5.6. <i>Caractéristiques de la formation des sphères dans les CSC</i>	44
1.5.7. <i>Résistance aux médicaments anticancéreux</i>	44
2. La méthionine.....	46
2.1. Le cycle de la méthionine	46
2.1.1. <i>La SAM</i>	46
2.1.2. <i>Les polyamines</i>	47
2.1.3. <i>La méthylation</i>	48
2.1.4. <i>La voie de la transsulfuration</i>	49
2.2. Le cycle des folates.....	49
2.3. Autres voies de la synthèse de la méthionine.....	50
2.3.1. <i>Par la SAM décarboxylée</i>	50
2.3.2. <i>Par la SAM</i>	51
2.4. Régulation du cycle de la méthionine	52
2.4.1. <i>Le rapport SAM/SAH</i>	52

2.4.2. La MTA	53
2.4.3. Régulation de la méthionine synthase	54
2.4.3.1. Méthionine synthase réductase	54
2.4.3.2. Régulation par les polyamines	56
2.4.3.3. Par la méthionine	56
2.4.3.4. Maladies de dysfonctionnement de la méthionine synthase.....	57
3. La vitamine B12 ou Cobalamine	58
3.1. Définition	58
3.2. Histoire	58
3.3. Nutrition	58
3.4. Structure chimique	59
3.5. Absorption	60
3.6. Transport	63
3.7. Stockage et élimination	63
3.8. Métabolisme cellulaire de la cobalamine.....	63
3.9. Les troubles du métabolisme de la vitamine B12	64
3.10. Carence en vitamine B12.....	66
3.10.1. Déficit d'apport	66
3.10.2. Défauts d'absorption.....	66
3.10.3. Conséquence de la carence en B12	66
3.10.4. Perturbation de l'interaction entre la vitamine B12 et les folates	66
4. Folates:.....	68
4.1. Structure chimique et nomenclature	68
4.2. Nutrition	69
4.3. Absorption et transport.....	72
4.4. Métabolisme.....	75
4.5. Santé humaine.....	80
4.6. Folates dans le traitement et prévention contre le cancer	82
5. Les modifications épigénétiques	84
5.1. La méthylation de l'ADN.....	85
5.1.1. Définition.....	85
5.1.2. La méthylation de l'ADN et le cancer	86
5.2. Les modifications des histones.....	86
5.2.1. Définition.....	86
5.2.2. L'acétylation des histones	87
5.2.3. La méthylation des histones.....	88
5.2.4. Les modifications des histones et cancer	88
6. La méthionine dépendance	90
6.1. Définition.....	90
6.2. Contrôle des cancers méthionine dépendants par des analogues de MTA et de l'adénine.....	95
6.3. Défauts dans la voie du métabolisme des folates qui peuvent contribuer au phénotype de méthionine dépendance	96
6.3.1. Modèles cellulaires et animaux pour une restriction en méthionine	98
6.3.2. La restriction en méthionine et le contrôle de la croissance du cancer	98
6.3.3. La restriction en méthionine et la chimiothérapie	99
6.4. La méthionine dépendance et les cellules souches	100
Objectifs d'étude	108
Résultats	110

1. Caractérisation des “tumor spheres” dérivées des cellules de glioblastome U251 versus cellules adhérentes monocouche (monolayer)	112
1.1. Conditions de culture des « tumor spheres » et des cellules adhérentes	112
1.2. La composition des milieux de culture « tumor spheres » et cellules adhérentes.....	112
1.3. Certaines cellules tumorales forment les « tumor spheres » plus facilement que d’autres	115
1.4. La formation des tumor spheres est fonction de l’agressivité de la tumeur.	116
1.5. Les tumor spheres sont pluripotentes	117
2. Les tumor spheres sont méthionine dépendantes jusqu’à une certaine concentration au-delà de laquelle la méthionine ralentit la croissance	124
3. Profils transcritomiques des « tumor spheres » et des cellules adhérentes par séquençage des ARNs	128
3.1. Transcriptomes : description générale.....	128
3.2. Le cycle cellulaire.....	131
3.3. Les histones	133
3.4. Métabolisme des nucléotides	139
3.5. Phosphorylation oxydative.....	141
3.6. La glycolyse.....	143
3.7. Les transporteurs ABC.....	143
3.8. Deptor.....	144
3.9. La signature « neural stemness » des cellules souches cancéreuses.....	146
3.10. Le métabolisme des groupements monocarbonés	147
3.11. Autres transcrits à expression différentielle	150
4. L’analyse du méthylome révèle que certains gènes impliqués dans le cycle des folates ont des promoteurs hypométhylés.....	154
4.1. Description générale	154
4.2. Les DMR modifiées.....	154
4.3. Intégration transcriptome/ méthylome	155
5. Implication du cycle des Folates dans le mécanisme de méthionine dépendance des Tumor spheres.....	159
5.1. Les gènes du cycle des folates sont sous-exprimés dans les « tumor spheres »	159
5.2. L’activité des enzymes impliquées dans le cycle des folates est diminuée dans les tumor spheres	160
5.3. L’addition de meTHF dans un milieu Met-Hcy+ restaure la formation des tumor spheres.....	165
5.4. Les métabolismes des tumor spheres formées en présence de méthionine et de 5-méthyle tetrahydrofolate semblent différents	166
Discussion	170
Matériels et Méthodes.....	182
Fiche 1: Décongélation cellulaire	184
Fiche 2 : Culture des monolayers	185
Fiche 3 : Culture des cellules souches	186
Fiche 4: Repiquage des monolayers.....	187
Fiche 5 : Repiquage des cellules souches	188
Fiche 6 : Congélation des monolayers.....	189
Fiche 7 : Marquage immunocytochimie.....	190
Fiche 8 : Extraction d’ARN	193
Fiche 9 : Quantification des ARN	195
Fiche 10: Vérification de qualité des ARN avec le Bioanalyseur Agilent	196
Fiche 11 : Extraction d’ADN (kit Machery Nagel)	199

Fiche 12 : Expression génique – qRT-PCR SYBR Green	200
Fiche 13 : les amorces utilisées en PCR quantitative	201
Fiche 14 : Marquage immunofluorescent sur cellules monolayers	202
Fiche 15 : Marquage immunofluorescent sur cellules souches	204
Fiche 16 : Préparation des librairies pour RNAseq.....	205
Fiche 17 : Méthylome.....	209
Fiche 18 : Analyses bioinformatiques.....	211
Fiche 19 : Dosage des acides aminés sur JEOL	216
Fiche 20 : dosage des folates sur LCMSMS	219
Fiche 21: Dosage B12, B9 par SimulTRAC-SNB.....	223
Annexe 1 : Composition du complément B27.....	225
Annexe 2 : Composition du milieu DMEM no methionine (Gibco 21010324).....	226
Annexe 3 : Composition du milieu DMEM-F12(D6434)	227
Annexe 4 : CARM1 et PRMT1 ne s'hétérodimérisent pas malgré la prédiction de l'existence dans l'hétérodimère d'une interface moléculaire similaire aux interfaces retrouvées dans les homodimères CARM1/CARM1 et PRMT1/PRMT1	228
Liste des références	252

Liste des figures

Figure 1: le rôle de Nanog, Sox2 et Oct3/4 dans les cellules souches embryonnaires.....	31
Figure 2: La hiérarchie des CSC dans une tumeur dépend des facteurs de niche et des mutations.	33
Figure 3: Le cycle de la méthionine (Yang and Vousden, 2016)	47
Figure 4: La voie de biosynthèse des polyamines (Kalac, 2014).	48
Figure 5: Voie de sauvetage de la méthionine (Tang <i>et al.</i> , 2000a).....	50
Figure 6: les différentes réactions de biosynthèse de la méthionine chez la levure.....	52
Figure 7: Mode d'action de la méthionine synthase réductase (Leclerc <i>et al.</i> , 1998).....	54
Figure 8: Structure de la méthionine synthase réductase (Leclerc <i>et al.</i> , 1998)	55
Figure 9: la vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) et ses différentes formes.....	60
Figure 10: Mécanisme d'absorption de la vitamine B12 (Andres <i>et al.</i> , 2004).....	62
Figure 11: <i>Métabolisme intracellulaire de la cobalamine (Watkins and Rosenblatt, 2011)</i>	65
Figure 12: La structure et la nomenclature de l'acide folique synthétique monoglutamate..	68
Figure 13: Structure des dérivés des folates.	69
Figure 14: L'absorption et la distribution du folate dans le foie et les tissus périphériques...	74
Figure 15: Le métabolisme des folates et des monocarbones (Lim <i>et al.</i> , 2007)	77
Figure 16: Mécanismes épigénétiques chez les eucaryotes	84
Figure 17: Mécanisme de la méthylation de l'ADN.....	85
Figure 18: Représentation schématique du nucléosome.	87
Figure 19: Réponse cellulaire et transcriptionnelle à la privation d'acides aminés individuels (Tang <i>et al.</i> , 2015).....	91
Figure 20: le métabolisme des monocarbones.	101
Figure 21: la voie de catabolisme de la sérine (Chakrabarti <i>et al.</i> , 2015).....	102
Figure 22: La restriction en méthionine réduit de manière significative la formation des mammosphères dans les cellules MCF7.	103
Figure 23: L'exposition des cellules MCF7 monocouches à une restriction en méthionine réduit de manière significative la formation des mammosphères.....	105
Figure 24: Formation des « tumor spheres » dérivées des lignées cellulaires de cancer du poumon A549 et de cancer du colon HCT116	115

Figure 25: Formation des “tumor spheres” dérivées de la lignée cellulaire U251 de glioblastome.....	115
Figure 26: la formation des tumor spheres est fonction de l’agressivité de la tumeur.....	116
Figure 27: Mesure de l’expression des gènes par RT-PCR et normalisation sur la moyenne géométrique de l’expression des gènes de référence TBP, RPL13a et HMBS ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$	117
Figure 28: les gènes de pluripotence et les enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine sont sur-exprimés et colocalisés dans les tumor spheres.....	118
Figure 29: Les marqueurs de pluripotence Sox2, Nanog et le marqueur des cellules souches CD133 sont sur-exprimés dans les tumor spheres.....	121
Figure 30 : Les marqueurs de prolifération KI67 et MCM6 sont sous-exprimés dans les tumor spheres.	122
Figure 31: les « tumor spheres » sont des cellules pluripotentes pouvant se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes.....	123
Figure 32: Les « tumor spheres » sont beaucoup plus méthionine dépendantes que les monolayers.....	125
Figure 33: Une concentration de méthionine rajoutée dans le milieu de culture, supérieure à 0.01 mM, réduit la croissance des « tumor spheres » sans que ce phénomène de ralentissement ne soit observé sur les cellules adhérentes.	127
Figure 34: les annotations fonctionnelles des principaux clusters exprimés de façon différente entre les « tumor spheres » et les cellules adhérentes	129
Figure 35: le cycle cellulaire est inhibé dans les cellules U251 « tumor spheres » comparativement aux cellules U251 adhérentes.	132
Figure 36: « heatmap » des gènes codants les histones.....	135
Figure 37 : Expression et position de linc00240 et des gènes codant les histones du cluster HIST1.....	136
Figure 38 Expression et position du Lin00869 et des gènes codant les histones dans le cluster HIST2.....	137
Figure 39 : Dans les « tumor spheres », certains lncRNA ont une variation opposée aux autres gènes dans un même cluster génomique	138
Figure 40 « heatmap » des gènes impliqués dans le métabolisme des pyrimidines.....	139
Figure 41 « heatmap » des gènes impliqués dans le métabolisme des purines.....	140
Figure 42: Représentation schématique de la voie de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie et classification hiérarchique des gènes de cette même voie.	142

Figure 43: Les gènes des transporteurs ABC sont principalement sur-exprimés dans les « tumor spheres »	144
Figure 44 Deptor, un inhibiteur de mTor est sur-exprimé dans les « tumor spheres »	145
Figure 45 : Une signature « neural stemness » est identifiée dans les «tumor spheres».....	147
Figure 46 “heatmap” des gènes impliqués dans le cycle des monocarbones.	148
Figure 47 « heatmap » des gènes impliqués dans le cycle de folate	149
Figure 48 Les gènes impliqués dans le cycle des folates sont majoritairement diminués dans les « tumor spheres »	149
Figure 49: Profil de méthylation des « tumor spheres » par rapport aux cellules adhérentes et lien avec les variations de transcription observées.	156
Figure 50: les gènes du cycle des folate sont sous-exprimés dans les tumor spheres.....	160
Figure 51: L’activité enzymatique du cycle des folates est diminuée dans les “tumor spheres”	163
Figure 52: Dans les “tumor spheres” le cycle des folates répond mal à la stimulation avec l’acide folique.	164
Figure 53: Le meTHF stimule significativement la croissance des U251 « tumor spheres » jusqu’à une dose optimale au-delà de laquelle l’effet sur la croissance s’amenuise....	165
Figure 54: l’activité enzymatique du cycle des folates est plus forte dans les “tumor spheres” formées en présence de méthionine que dans celles formées dans un milieu met-hcy+ supplémenté en meTHF.	167
Figure 55: Le pipeline d’analyse pour le RNA-seq.....	215
Figure 56: Putative assembly of CARM1 and PRMT1 monomers to form a heterodimer.....	239
Figure 57: A549 and HT1299 cell growth measured by MTT assay.	240
Figure 58 In A549 and HT1299 cells, anti-PRMT1 does not co-precipitate endogenous CARM1 and anti-CARM1 does not co-precipitates endogenous PRMT1 neither at day 6 in the proliferation phase nor at day 9 when the cells stop proliferating.	241
Figure 59: In HT1299 cells, HA-CARM1 does not interact neither with PRMT1 nor FLAG-PRMT1 neither at day 6 in the proliferation phase nor at day 9 when the cells stop proliferating.....	241
Figure 60: Wild type ser229 HA-CARM1 ad mutated variants ser229ala and ser229glu localize in both the nucleus and cytoplasm.	243

Abréviations

5-formylTHF: 5-formyltétrahydrofolate

5-meTHF: 5-méthyltétrahydrofolate

5-methylDHF: 5-méthyldihydrofolate

5,10-méthylèneTHF: 5,10-méthylène
tétrahydrofolate

5'ad: 5'désoxyadénosylcobalamine

a-KB : a-ketobutyrate

AA: acide aminé

ABC: ATP binding cassette

ABCB5: ATP Binding Cassette Subfamily B
Member 5

ABCD4: ATP-binding cassette transporter
D4

ABCG2: ATP Binding Cassette Subfamily G
Member 2

ACVR1C: Activin Receptor-Like Kinase 7

ADCY1 Adenylate Cyclase 1

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

AdoCbl: Adénosylcobalamine

ADP: Adénosine diphosphate

AHCY S-adenosylhomocysteine hydrolase

AICAR: ribonucléotide aminoimidazol-4-
carboxamide

AICART :Phosphoribosylaminoimidazoleca
rboxamide formyltransferase

Ala: Alanine

ALDH1: Aldéhyde déshydrogénase 1

AMD1: Adenosylmethionine

Decarboxylase 1

AMT, aminomethyltransferase

ANC: Apports nutritionnels conseillés

ANR: Apports nutritionnels recommandés

Arg: Arginine

ARN: Acide Ribonucléique

ARNt: acides ribonucléiques de transfert

Asn: Asparagine

Asp: Aspartate

ATIC: 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide
Ribonucleotide

ATP: Adénosine TriPhosphate

ATR: cobalaminadenosyltransférase

AXIN2: Axis Inhibition Protein 2

B12 : vitamine B12

B6, vitamin B6

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor

BHMT : betaine-homocysteine
methyltransferase

BMP: Bone morphogenetic proteins

BMPR1B: Bone Morphogenetic Protein
Receptor Type 1B

BRCA1: breast cancer 1

BRCA2: breast cancer 2

BSA: Bovine Serum Albumin

c-Met: MET Proto-Oncogene, Receptor
Tyrosine Kinase

c-Myc: MYC Proto-Oncogene, BHLH
Transcription Factor

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate

CARM1: Co Activator Arginine
Methyltransferase 1

Cbl: Cobalamin
 CBS : cystathionine-beta-synthase
 CD117: Stem Cell Growth Factor Receptor Kit
 CD13: Alanyl Aminopeptidase
 CD133: Promininine
 CD15: Fucosyltransferase 4
 CD166: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
 CD20: B-Lymphocyte Antigen
 CD24: Small Cell Lung Carcinoma Cluster 4 Antigen
 CD26: Dipeptidyl Peptidase 4
 CD271: Nerve Growth Factor Receptor
 CD29: Integrin Subunit Beta 1
 CD320: Transcobalamin Receptor
 CD38: ADP-Ribosyl Cyclase 1
 CD44: Récepteur à l'acide hyaluronique
 CD90: Thy-1 Cell Surface Antigen
 CDC6: Cell Division Cycle 6
 CGL : cystathionine lyase
 CITRUL: citrulline
 CL4: Endogenous Retrovirus Group W Member 3
 CN: Cyanocobalamine
 CSC: Cellules Souches Cancéreuses
 CSPi: Cellules souches pluripotentes induites
 CTH : cystathionase
 CTNNB1: Catenin Beta 1
 CXCR4: Leukocyte-Derived Seven Transmembrane Domain Receptor
 Cys: Cystéine
 DAPI: 4, 6-Diamidino-2-Phenylindole
 DEPTOR: DEP Domain Containing MTOR Interacting Protein
 DHF : Dihydrofolate
 DHFR : Dihydrofolate reductase
 DHFRL1: Dihydrofolate Reductase 2
 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
 DMG : dimethylglycine
 DMR: Differentially methylated regions
 DNMT: ADN méthyltrasnférase
 dTMP: deoxythymidine monophosphate
 DTT: Dithiothréitol
 dUMP, deoxyuridine monophosphate
 E2F2: E2F Transcription Factor 2
 EGF: epidermal growth factor
 EIF-4E: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
 ELF4: E74 Like ETS Transcription Factor 4
 ER: Estrogen Receptor
 F-THF : 10-formyltetrahydrofolate
 FAD: Flavine adénine dinucléotide
 FAICAR:N-formylaminoimidazol-4-carboxamide
 FDA: Food and Drug Administration
 FGAR: ribonucléotide N-formylglycinamide
 FGF: facteurs de croissance desfibroblastes
 FGF10: Fibroblast growth factor 10
 FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1
 FMG: monoglutamates de folate

FMN: Flavine mononucléotide
 FOLR, folate receptor
 FPG: Polyglutamates de folate
 FPGS, folylpolyglutamate synthase
 FR α : folate receptor α
 FR β : folate receptor β
 FRY: folate receptor Y
 FTHF: Acide 10-formyltétrahydrofolique
 FTHFD, 10-formyltetrahydrofolate
 dehydrogenase
 FTHFS, 10-formyltetrahydrofolate
 synthase
 FTHFSDC1, 10-formyltetrahydrofolate
 synthetase domain containing 1
 GAR: ribonucléotide glycinamide
 GART, glycinamide ribonucleotide
 formyltransferase
 GCP II, glutamate carboxypeptidase II
 GCSH, glycine cleavage system protein H
 GDP: guanosine diphosphate
 GFAP: La protéine acide fibrillaire gliale
 GGH, gamma-glutamylhydrolase
 GLDC: glycine decarboxylase
 Gln: Glutamine
 Gly: Glycine
 GNMT: Glycine N-Methyltransferase
 GOT1: Glutamic-Oxaloacetic Transaminase
 1
 GOT2: Glutamic-Oxaloacetic Transaminase
 2
 GOTIL1
 GPI: GlycosylPhosphahtidylInositol
 GTP: guanosine triphosphate
 HA : Human Influenza Hemagglutinin
 HAT: histone acétyltransférases
 Hcy: homocystéine
 hCYS : homocysteine
 HDAC: histnes déacétylases
 HES: Hematoxylin and eosin stain
 HGF: Hepatocyte Growth Factor
 HKMT: histone lysine méthyle transférases
 HMBS: Hydroxymethylbilane Synthase
 hPCFT: Transporteur des folates couplé
 aux protons
 HuR: Human Antigen R
 ID1: Inhibitor Of DNA Binding 1, HLH
 Protein
 ID3: Inhibitor Of DNA Binding 3, HLH
 Protein
 IF Facteur intrinsèque
 Ile: isoleucine
 ILEU: Isoleucine
 Îlots CpG
 IP3: inositol trisphosphate
 K: Lysine
 KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and
 Genomes
 KI67: Marker Of Proliferation Ki-67
 KLF4: Epithelial Zinc Finger Protein
 LEFTY2: Transforming Growth Factor,
 Beta-4 (Endometrial Bleeding-Associated
 Factor)
 Leu: Leucine

LGR5: Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5
LIFR: Leukemia Inhibitory Factor Receptor Alpha
LMBD1: Nuclear Export Signal-Interacting Protein
LncRNA: Long non-coding RNA
LYS: Lysine
M6a: N6- méthyladénosine
MAPK p53-p38
MAT : methionine adenytransferase
MAT, methionine S-adenosyltransferase
MAT1A: Methionine Adenosyltransferase 1A
MAT2B: Methionine Adenosyltransferase 2B
MCM: MéthylmalonylCoA mutase
MCM2: Minichromosome Maintenance Complex Component 2
MCM6: Minichromosome Maintenance Complex Component 6
me-THF : 5,10-methylene-THF
MeCbl: Méthylcobalamine
MEIS1: Meis1, Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1
MET : methionine
MeWO-LC1: variant of human melanoma cell line
Mht1: Homocysteine S-methyltransferase 1
mm: millimeter
mM: millimolaire

MMAA: Methylmalonic aciduria type A
MMACHC: méthylmalonic aciduria cobalamin deficiency CblC type with homocystinuria
MMADHC: Methylmalonic Aciduria And Homocystinuria, CblD Type
MNTHF: methylene tetrahydrofolate
MRI1: methylthioribose-1-phosphate isomerase 1
MS: Methionine synthase
MS-CO
MSR: Methionine synthase reductase
MTA: Metastasis-associated protein
MTAP: S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase
MTDIA: méthylthio-DADMe-Immucillin-A
MTFMT: Mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase
mTHF : 5-methyltetrahydrofolate
MTHFD: methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase
MTHFD1: cytoplasmic 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
MTHFD2 : mitochondrial 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
MTHFR: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
MTHFS: 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase

MTHFSD: Methenyltetrahydrofolate Synthetase Domain Containing
 mTOR: mechanistic Target of Rapamicine
 mTORC1: mTOR Complex 1
 MTR, methionine synthase
 MTRR, methionine synthase reductase
 MTs, a group of methyltransferases
 MTT: 3-(4,5-Dimethylthiawol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
 MTX, methotrexate
 NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NANOG: Nanog Homeobox
 NEUN: neuronal nuclei
 NHANES: National Health and Nutritional Examination Survey
 NOD-SCID: nonobese diabetic/ severe combined immunodeficiency
 NR1: Novel reductase 1
 Oct3/4: Octamer binding protein 3/4
 OCT4: octamer-binding transcription factor 4
 ODC: ornithine decarboxylase
 OLIG2: Oligodendrocyte Transcription Factor 2
 ORN: Ornithine
 PABP1: Poly(A)-Binding Protein
 PBS: Phosphate Buffer Saline
 PCR: Polymerase Chain Reaction
 PDE1C: Phosphodiesterase 1C
 PDE5A: Phosphodiesterase 5A
 PEGylation: polyéthylène glycol
 PEM, pemetrexed
 PH: Potentiel d'hydrogène
 Phase G1: Gap 1 phase
 Phase G2: Gap 2 phase
 Phase S: Synthesis phase
 Phe: Phénylalanine
 PIK3: phosphoinositide 3-kinase
 PKA: Protein Kinase A
 PLA1: phospholipase A1
 PLA2: Phospholipase A2 Group IIA
 PLP, pyridoxal 5'-phosphate
 PRMT: Protein Arginine Methyl Transferase
 PRMT1: Protein Arginine Methyl Transferase
 PRO: Proline
 R: Arginine
 RFC: Reduced Folate Carrier
 RPL13a: Ribosomal Protein L13a
 RRM2: Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2
 S: serine
 S6K: Ribosomal Protein S6 Kinase B1
 SAH : S-adenosylhomocysteine
 SAHH : S-adenosyl homocysteine hydrolase
 SAM : S-adenosylmethionine
 Sam4: S-adenosylmethionine-homocysteine S-methyltransferase
 SCID: Severe combined immunodeficiency
 SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate
 Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SE: souches embryonnaires
Ser: Serine
SHH: Sonic Hedgehog
SHMT: serine hydroxymethyltransférase
SHMT1, cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase
SHMT2, mitochondrial serine hydroxymethyltransferase
SLC19A1, reduced folate carrier
SMAD3: SMAD Family Member 3
SMS: Spermine Synthase
SOX2: SRY-Box 2
SP side populations
STAT3: Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
SV40: simian virus 40
SV80: simian virus 80
SVF: Sérum de veau foetal
SVZ: Zone sous-ventriculaire
T: Thréonine
TAU: taurine
TBP: TATA-Box binding protein
TBX3: T-box 3
TCAF: Tri des cellules activées par fluorescence
TCbIR: Transcobalamin Receptor
TCII: transcobalamine II
TCN1, transcobalamin 1
TCN2, transcobalamin 2
TDH: threonine déshydrogénase
THF : tetrahydrofolate
Thr: Thréonine
THRB: Thyroid Hormone Receptor Beta
TK1: Thymidine kinase 1
Trop2: Tumor Associated Calcium Signal Transducer 2
Trp: Tryptophane
TS : thymidylate synthase
TYMS, thymidylate synthetase
Tyr: Tyrosine
Val: Valine
Wnt: Wingless integration site
 μm : micrometer
 μM : micromolaire

Préambule

Je tiens à porter à la connaissance du jury que, juste après mon inscription en thèse, j'ai travaillé pendant un an et demi sur un projet concernant l'interaction entre CARM1 et PRMT1 qui sont des "Protein Arginine MéthylTransférases". Ce projet n'a pas été productif notamment par manque des outils de recherche nécessaires. Néanmoins, j'ai décrit les résultats que j'ai obtenus dans un article qui est prêt à être soumis. Une description plus détaillée du travail sur CARM1/PRMT1 ainsi que l'article décrivant les résultats sont présentés dans l'annexe 4. Ce sujet a été abandonné ensuite par le laboratoire. Pendant la deuxième moitié de ma thèse (les derniers un an et demi), j'ai travaillé sur la méthionine dépendance dans les cellules souches cancéreuses. C'est ce dernier projet qui constitue le sujet de ma thèse qui est présenté dans ce manuscrit.

Les mécanismes moléculaires de la méthionine dépendance des cellules souches cancéreuses

Introduction

1. Les cellules souches

1.1. Définition des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées qui sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en au moins un type cellulaire. Elles se caractérisent par la prolifération, l'auto renouvellement et la maintenance d'un état indifférencié leur permettant de générer une variété de lignées cellulaires (Potten and Loeffler, 1990). Les cellules souches peuvent être classées selon leur capacité de différenciation, on distingue alors:

Les cellules souches totipotentes: cellules issues du zygote au stade 8 cellules, pouvant se différencier en tous les types cellulaires: embryonnaires et extra-embryonnaires.

Les cellules souches pluripotentes: appelées également cellules souches embryonnaires, ces cellules sont des cellules filles issues des cellules souches totipotentes qui ont formé la masse interne cellulaire de l'embryon au stade blastocyte 40 cellules. Elles ont le potentiel de donner les cellules des trois feuillets embryonnaires mais par contre elles ne peuvent plus générer les cellules du trophoctoderme qui sont à l'origine des cellules des annexes embryonnaires.

Les cellules souches multipotentes: cellules 'déterminées' pouvant fournir différents types de cellules mais seulement celles issues d'une lignée cellulaire : ectoderme, mésoderme, ou endoderme.

Les cellules souches unipotentes: cellules pouvant se différencier en un seul type cellulaire mais aussi capables de s'auto-renouveler

Les cellules progénitrices: cellules pouvant se différencier en un seul type cellulaire avec une capacité limitée d'auto-renouvellement.

Les cellules souches adultes ne possèdent pas la même potentialité que celle des cellules souches embryonnaires (SE), mais elles sont nécessaires pour la maintenance de l'homéostasie du tissu et la réparation en cas de blessure. Ces cellules maintenues dans leur état indifférencié, se situent dans une niche de cellules souches qui est spécifique pour chaque organe. Cette niche sert à l'action régulatrice homéostatique des cellules souches, afin d'assurer un remplacement continu des cellules.

1.2. Cellules souches et facteurs de transcription.

Les cellules souches embryonnaires maintiennent leur pluripotence à partir de l'expression des facteurs de transcription comme Oct3/4. La surexpression de Oct3/4 induit la

différentiation des cellules en mésoderme et endoderme, tandis que la sous-expression induit la formation du trophoctoderme (les trophoblastes se différencient de cette couche de cellules). D'autres éléments régulateurs importants, tels que Nanog et Sox2, ont été aussi impliqués dans le contrôle de la pluripotence et de la maintenance de l'identité des cellules souches (Wobus and Boheler, 2005) (Figure 1).

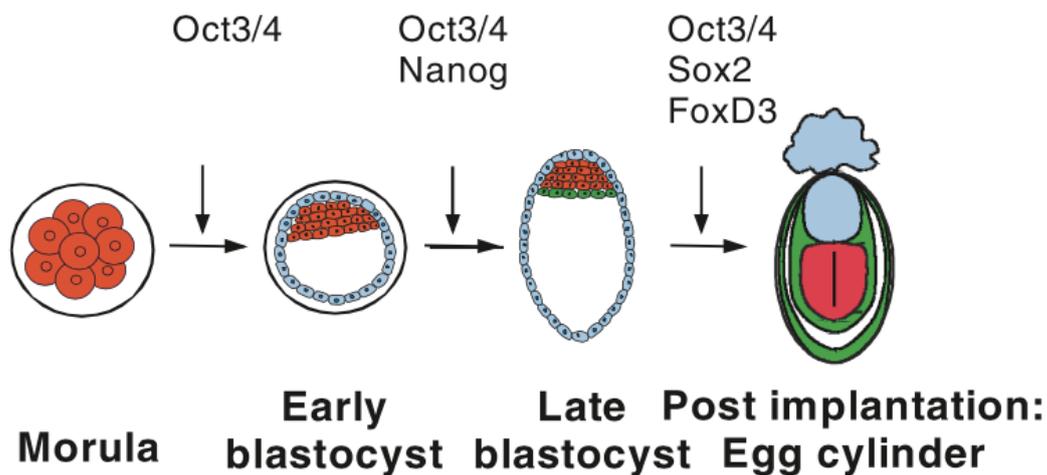


Figure 1: le rôle de Nanog, Sox2 et Oct3/4 dans les cellules souches embryonnaires

Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la maintenance de la pluripotence chez l'embryon en développement (Wobus and Boheler, 2005)

1.3. Cellules souches pluripotentes induites (CSPi)

Afin de ne plus utiliser les cellules souches pluripotentes humaines en recherche, Yamanaka et al trouvent que l'introduction des facteurs de transcription originalement présents dans les cellules souches embryonnaires, Oct3/4, Sox2, KLF4 et c-Myc, via des agents viraux dans des fibroblastes de souris, induisent une dé-différentiation des cellules vers la pluripotence, propriété fondamentale des cellules souches embryonnaires. D'où le principe de la pluripotence induite (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ultérieurement en 2007, cette même équipe utilise ce principe sur des cellules humaines adultes (Takahashi *et al.*, 2007).

1.4. Cellules souches et cancer

La similitude la plus importante entre les cellules cancéreuses et les cellules souches est leur capacité à s'autorenouveler, ce qui suggère qu'elles peuvent partager certaines voies de signalisation communes. La connaissance de ces mécanismes communs d'autorenouvellement pourrait permettre de contrôler l'autorenouvellement des cellules

souches cancéreuses. Parmi les voies de signalisation communes aux cellules cancéreuses et aux cellules souches, citons : Notch, Shh, Wnt et les facteurs de transcription Nanog, Oct3/4 et Sox2. (Burdon *et al.*, 1999; Wobus and Boheler, 2005)

1.5. L'hypothèse des cellules souches cancéreuses (CSC).

Dans tous les types de tumeurs, l'hétérogénéité est observée sur tous les aspects, notamment la morphologie, les taux de prolifération, les altérations génétiques et la réponse thérapeutique. Cette hétérogénéité indique qu'il existe une grande diversité cellulaire au sein d'une tumeur. Les mutations séquentielles fournissent une explication rationnelle à cette hétérogénéité. Cependant, la théorie de l'évolution clonale n'a pas pu répondre à toutes les questions, telles que la réapparition de lésions métastatiques après élimination (supposée) de la tumeur ou la survenue de métastases avec tumeur primaire inconnue. Ces questions non résolues ont incité à explorer de nouveaux mécanismes pouvant expliquer la résurgence tumorale. Une nouvelle perspective consiste à considérer que certaines cellules cancéreuses peuvent acquérir l'armement moléculaire des cellules souches embryonnaires et adultes. Cette approche a donné naissance à l'hypothèse selon laquelle les cellules souches cancéreuses (CSC) peuvent générer une descendance différenciée pour maintenir la tumeur, l'auto-renouvellement et la survie, même après une exposition aux chimio-radiothérapies, entraînant ainsi la réapparition de la tumeur (Clevers, 2011; Dick, 2008; Lander, 2009; Reya *et al.*, 2001; Rosen and Jordan, 2009; Visvader, 2011) (Figure 2).

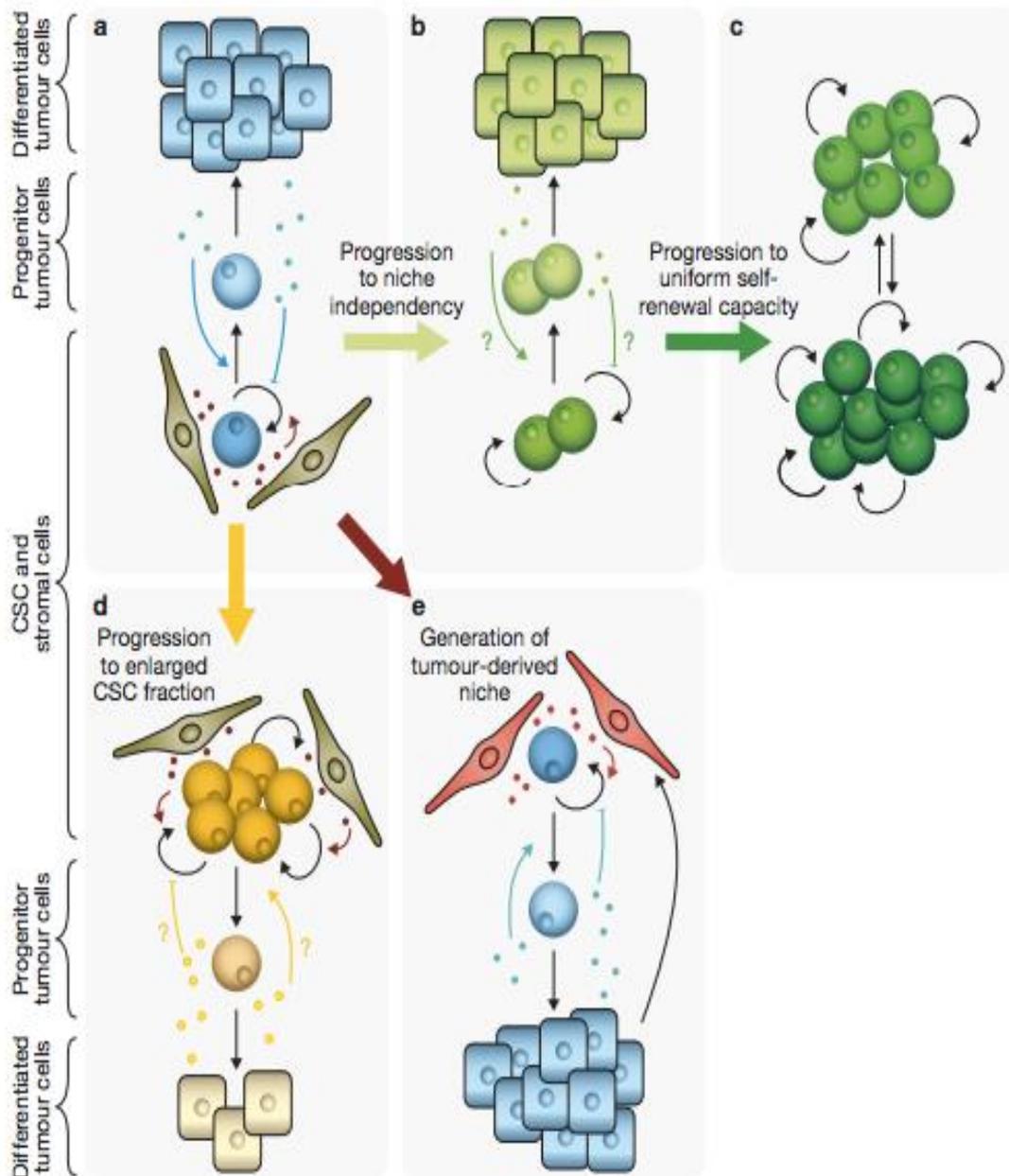


Figure 2: La hiérarchie des CSC dans une tumeur dépend des facteurs de niche et des mutations.

(a) Les tumeurs forment un équilibre entre CSC (cellules rondes bleu foncé), cellules de type progénitrice (cellules rondes bleu pâle) et cellules tumorales (cellules carrées bleu clair). Les CSC sont soutenues par des cellules stromales, dont les myofibroblastes, les cellules stellaires, les monocytes et les cellules endothéliales (marron). Ces cellules stromales peuvent sécréter des facteurs (points marron) qui régulent l'auto-renouvellement du CSC (flèche circulaire). Les cellules tumorales peuvent sécréter des facteurs (points bleus), tels que les BMP, qui limitent l'auto-renouvellement et favorisent la différenciation (flèches bleues). (b) étape de

progression qui rend les CSC (cellules rondes vert foncé) indépendantes des facteurs dérivés de la niche, par exemple le HGF produit par des cellules stromales. Que cela soit en corrélation avec l'insensibilité aux mécanismes de régulation (flèches vertes avec des points d'interrogation) imposés par des cellules différenciées (cellules vertes claires), ou que cela améliore le potentiel métastatique, ça reste incertain et nécessite une recherche plus poussée. (c) étape de progression de l'état indépendant de la niche à une tumeur dans laquelle toutes les cellules contiennent un potentiel d'auto-renouvellement. Cette progression peut également se produire directement à partir de l'état dépendant du microenvironnement (a), ou même directement à partir des cellules normales (non représentées). Les mutations qui conduisent à cet auto-renouvellement et sa dépendance ne sont pas bien définies. (d) étape de progression en raison de la mutation ou de la régulation épigénétique qui améliore le potentiel d'auto-renouvellement des CSC (cellules rondes orange) et conduit ensuite à l'expansion du pool CSC. Ceci est susceptible d'améliorer également la propension à métastaser et peut également affecter négativement la différenciation. La question de savoir si cela a un effet sur les mécanismes de réglementation (flèches jaunes) exercées par des cellules tumorales différenciées n'est pas claire (point d'interrogation). (e) Progression à un état dans lequel les cellules tumorales génèrent leur propre niche en se différenciant en types cellulaires spécifiques, par exemple des cellules de type endothélial (rouge) dans les glioblastomes. Pour plus de simplicité, cela se manifeste comme une étape de progression, mais il peut aussi se produire directement, selon la tumeur (Medema, 2013).

La première preuve expérimentale de l'hypothèse des CSC provient des observations faites par Furth et Kahn en 1937 (Furth *et al.*, 1937), lorsqu'une seule cellule leucémique d'une souris a été injectée dans une souris consanguine, entraînant une transmission de la leucémie. En 1994, la première preuve expérimentale concernant l'identité de la cellule initiatrice de la tumeur a été rapportée. Des profils spécifiques de marqueurs de surface cellulaire ont été utilisés conjointement avec le Tri des Cellules Activées par Fluorescence (TCAF) pour identifier les populations présentant des caractéristiques de cellules souches cancéreuses; Ces cellules ont été définies par un phénotype de surface CD34⁺ CD38⁻ (Lapidot *et al.*, 1994).

Plus récemment, les cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans plusieurs types de tumeurs, y compris le colon, le sein, la prostate, le foie, le cerveau, le mélanome, le myélome multiple et le glioblastome (Al-Hajj *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005; Eramo *et al.*, 2008; Ignatova *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007). Il est maintenant admis que la majorité des tumeurs ont de petites sous-populations de cellules présentant des caractéristiques de cellules souches qui ont la capacité de générer toutes les populations cellulaires de types différents trouvées dans la tumeur originale. Les propriétés des cellules souches cancéreuses ont été classiquement démontrées dans le modèle de souris NOD-SCID (Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency), en montrant que la transplantation de populations pures isolées peut reproduire la tumeur de façon répétitive lors du passage en série et maintenir la même caractéristique morphologique de la tumeur originale. Les CSC sont généralement considérées comme constituant seulement une petite fraction des cellules dans la tumeur, mais elles fournissent la force motrice derrière la tumeur maligne. Les tumeurs qui contiennent des charges plus élevées de CSC sont associées à des taux de métastases plus élevés, à un mauvais pronostic du patient et à une résistance accrue aux agents chimio-radiothérapeutiques (Kosovsky, 2012). D'un point de vue clinique, le problème principal, actuellement, avec les CSC, c'est qu'elles sont résistantes aux protocoles de chimio-radiothérapies approuvés; une caractéristique proposée comme la raison fondamentale de la récurrence des tumeurs.

Il n'est toujours pas clair si les CSC proviennent de la transformation de cellules souches spécifiques, de leurs descendances ou des descendants dédifférenciés des cellules néoplasiques matures. L'origine des cellules souches cancéreuses dans chaque tumeur spécifique n'a pas encore été vraiment définie. Le modèle des CSC se développe à partir de

sa définition originale d'une sous-population petite et distincte, et on a laissé entendre que les CSC pourraient englober des cellules plus communes et plus hétérogènes. En outre, les CSC sont maintenant considérées comme des entités dynamiques et réversibles dans le cancer, disposant d'un devenir orienté par le microenvironnement de la tumeur (Kosovsky, 2012).

La compréhension du comportement de cette petite population de cellules, connues par de nombreux noms différents (cellules initiatrices de tumeur, cellules souches cancéreuses et cellules cancéreuses liées au cancer) est devenue l'objectif principal des chercheurs sur les cellules souches pour la découverte et le développement des thérapies médicamenteuses contre le cancer.

1.5.1. Exploration historique des 2 modèles de l'origine du cancer : stochastique et hiérarchique

Une tumeur est un tissu très hétérogène. Deux modèles de l'origine et de la progression tumorales ont été présentés pour illustrer cette hétérogénéité (Grimwade and Enver, 2004).

Le modèle stochastique : toutes les cellules tumorales ont une capacité élevée à proliférer. N'importe quelle cellule peut proliférer indéfiniment et former un clone tumoral suite à de mutations aléatoires. Selon ce modèle, l'hétérogénéité tumorale résulte donc de mutations et ensuite d'une sélection clonale. L'hétérogénéité tumorale est attribuée à la différenciation, ainsi qu'à des facteurs intrinsèques comme les variations génétiques et épigénétiques et à des facteurs extrinsèques comme les influences du microenvironnement.

Le modèle hiérarchique, ou « l'hypothèse des cellules souches cancéreuses » : Une petite fraction de la population tumorale, les cellules souches cancéreuses, sont à l'origine du cancer. L'hétérogénéité tumorale résulte donc d'un arrêt de différenciation des cellules à différents stades.

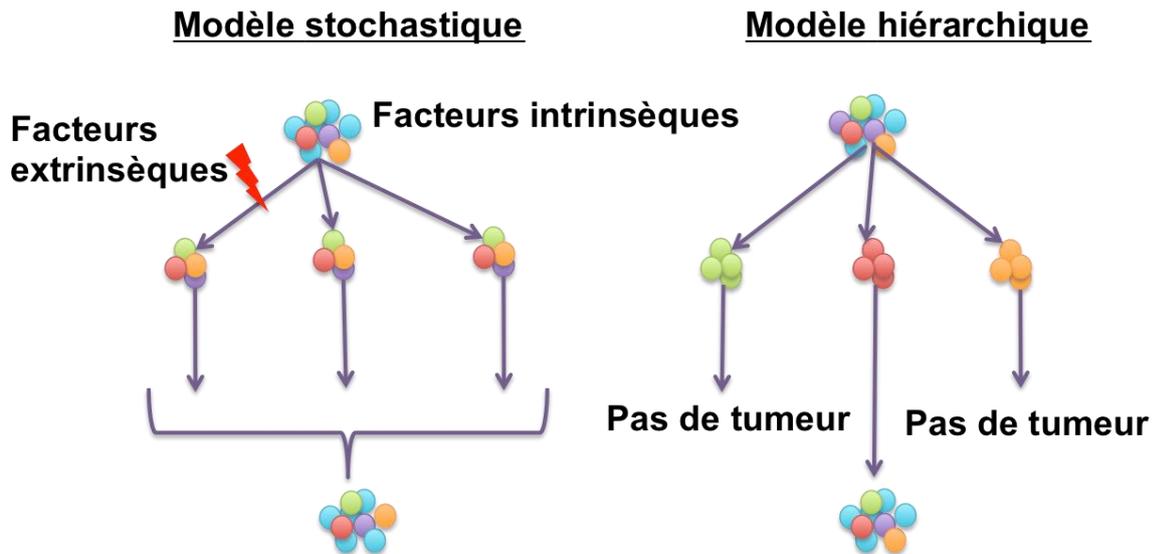


Figure 3 : Représentation des deux modèles pouvant expliquer l'hétérogénéité tumorale

1.5.1.1. L'étude des tératocarcinomes

En 1967, Leroy STEVENS a transplanté des cellules primordiales germinales provenant des crêtes génitales d'embryons mâles d'une souche de souris ayant la possibilité de former spontanément une tumeur testiculaire dans les testicules normaux d'adultes. Les cellules souches germinales ont formé un tératocarcinome au site de transplantation (Sell, 2010).

Il a également isolé des cellules de carcinome embryonnaire (EC) de ces tératocarcinomes à partir desquelles une nouvelle tumeur testiculaire a pu être formée. Ces cellules EC furent cultivées par Martin et Evans en 1974 (Martin and Evans, 1974) et confirmées par la suite en 2005 (Damjanov, 2005).

En 1975, Mintz et Illmansee ont injecté des cellules de tératocarcinomes dans des blastocystes normaux (Mintz and Illmensee, 1975). Les cellules EC ont contribué au développement embryonnaire et des souris chimères sont nées. Ce qui montre que les cellules EC injectées dans les blastocystes sont des cellules souches embryonnaires totipotentes.

En 1994, Sell et al. ont proposé un modèle hiérarchique pour expliquer le rôle des cellules souches embryonnaires dans le développement des tératocarcinomes: les cellules souches prolifèrent pour donner naissance à des cellules cancéreuses plus ou moins différenciées (Sell and Pierce, 1994).

Dans les années 1970, la théorie des cellules souches cancéreuses a été clairement établie grâce à l'étude des tératocarcinomes (Damjanov and Solter, 1976).

1.5.1.2. L'étude des hépatocarcinomes

Par contre, dans les années 1980, un modèle stochastique ou dédifférenciation de cellules matures a été suggéré pour expliquer l'origine des hépatocarcinomes dans des études de carcinogénèse chimique sur le foie. Il est possible d'induire expérimentalement un hépatocarcinome sur des animaux de laboratoire en les soumettant à un hépatocarcinogène, par exemple, de nature chimique. L'exposition au carcinogène induit des changements morphologiques de quelques hépatocytes : foyers ensuite nodules pour arriver à l'apparition de carcinomes dans les nodules (Sell and Pierce, 1994). La conclusion de ces événements est que le cancer du foie provient de la dédifférenciation d'hépatocytes déjà matures.

Après les années 1980, ABELEV a remarqué que l'AFP (l'alpha-foetoprotéine), un marqueur de développement oncogénique, est présente en très forte concentration dans le sérum des animaux nouveau-nés ; sa production s'arrête 3 à 5 semaines après la naissance chez le rat. Il remarqua aussi que la concentration d'AFP augmente de lors du développement d'une tumeur hépatique (Sell, 2010). De même, cette augmentation de la concentration d'AFP sérique est notée aussi avant la formation des nodules ce qui indique que les nodules ne sont pas les éléments précurseurs de l'hépatocarcinome.

Ces observations remettent en cause la validité de l'hypothèse des années 1970 de dédifférenciation des hépatocytes comme mécanisme à l'origine du cancer du foie.

En 1967 et 1977, Fialkow et al. ont étudié la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD), enzyme spécifique codée au locus Gd sur le chromosome X, chez des femmes atteintes de leucémie myéloïde chronique hétérozygotes au locus Gd. Ils ont analysé les variants électrophorétiques exprimés dans les fibroblastes, les granulocytes (GN) et les globules rouges (GR) de trois femmes. La migration électrophorétique permettait de distinguer les deux variants, GdA et GdB, de la G-6-PD. Après électrophorèse, ils ont trouvé les deux variants alléliques GdA et GdB dans les extraits cellulaires de fibroblastes des 3 patientes confirmant leur hétérozygotie au locus Gd. En revanche, les extraits cellulaires d'érythrocytes (GR) et de granulocytes (GN) ne présentaient qu'un seul variant allélique, GdA ou GdB (Fialkow *et al.*, 1967; Fialkow *et al.*, 1977).

L'hypothèse qui peut expliquer ce résultat est que le cancer a une origine monoclonale. D'autres études sur le chromosome Philadelphie aboutirent à la même conclusion sur l'origine monoclonale du cancer (Janossy *et al.*, 1976; Walker and Hardy, 1976).

1.5.1.3. L'étude des leucémies myéloïdes de l'homme et première identification des cellules souches cancéreuses

Fialkow et al. ont montré ultérieurement que les leucémies myéloïdes chroniques ont pour origine une cellule commune aux lignées granulocytaire, érythrocytaire et plaquettaire (Fialkow *et al.*, 1977). Il s'agit d'une cellule souche (CS) ou d'un progéniteur précoce. Toutes les lignées ne sont pas atteintes de la même manière. En 1997, Bonnet et al. ont montré ultérieurement que les leucémies myéloïdes aiguës sont organisées selon le modèle hiérarchique et qu'elles ont comme origine une cellule hématopoïétique primitive. Le cancer a une origine monoclonale. La cellule initiatrice de cancer est très haute dans la hiérarchie cellulaire : un progéniteur précoce ou une cellule souche (Bonnet and Dick, 1997).

La démonstration sur cultures cellulaires humaines a été approfondie par des expérimentations InVivo :

Une étude en 1963 a démontré que la xénotransplantation de 100 cellules d'un lymphome T dans une souris saine produit une tumeur. De plus, le nombre de colonies développées dans la rate est proportionnel au nombre de cellules cancéreuses injectées (Bruce and Van Der Gaag, 1963). Des études supplémentaires utilisant des modèles murins immunodéficients (Lapidot *et al.*, 1994) ont mis en évidence le fait que seules certaines cellules sont tumorigènes in vivo.

L'étude en cytométrie de flux de sang périphérique et de moelle osseuse de patients leucémiques a permis pour la première fois en 1994, d'identifier une cellule à l'origine de la leucémie (Lapidot *et al.*, 1994). Ce type de cellules exprimait le marqueur CD34 qui est un des marqueurs des cellules souches, mais n'exprimait pas le marqueur CD38 (qui caractérise les cellules sanguines différenciées) et il représenterait moins de 1% des cellules cancéreuses. De même, Bonnet et Dick, ont constaté en 1997 que ces cellules CD34+/ CD38- présentaient les propriétés de cellules souches avec la capacité d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation (Bonnet and Dick, 1997).

Les leucémies sont structurées sous une configuration hiérarchique possédant au sommet une cellule initiatrice. L'exploration de ces CSC dans les leucémies a poussé les chercheurs à étudier sur d'autres tumeurs avec les mêmes méthodes d'isolement et d'identification. C'est ainsi que des CSCs ont été retrouvées dans plusieurs tumeurs et surtout dans le cancer du sein (Al-Hajj *et al.*, 2003), et dans les glioblastomes (Ignatova *et al.*, 2002).

1.5.1.4. Identification de cellules souches cancéreuses dans les glioblastomes

En 2003, en utilisant le marqueur CD133, des CSCs ont été isolées d'une suspension unicellulaire de tumeur cérébrale pédiatrique (Singh *et al.*, 2003). Ces cellules CD133+ en culture produisent des neurosphères. Elles ont un potentiel de différenciation, d'auto-renouvellement et de prolifération. Ces CSC peuvent aussi régénérer la tumeur originale in vivo et in vitro.

Hemmati et al. ont noté que les neurosphères dérivées de glioblastomes chez l'enfant après les avoir introduites dans le cerveau de rats ont des capacités de prolifération, tumorigenèse et différenciation (Hemmati *et al.*, 2003).

En 2004, des études (Singh *et al.*, 2004) ont relevé l'existence de cellules CD133+ dérivant de glioblastomes d'enfant et de glioblastomes d'adulte, pouvant reconstituer la tumeur initiale après transfert dans le cerveau des souris immunodéprimées. Ces glioblastomes contiennent des CSC. Un petit nombre de CSC CD133+ est suffisante pour établir une tumeur, alors qu'avec plusieurs cellules CD133- dans les mêmes conditions, aucune tumeur ne se peut se former.

1.5.2. La cellule souche cancéreuse responsable de la formation de la tumeur

1.5.2.1. Les propriétés communes avec la cellule souche normale

Les cellules souches cancéreuses possèdent la plupart des caractéristiques des cellules souches normales comme l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation (Lapidot *et al.*, 1994). De même elles peuvent avoir une activation de voies de signalisation anti-apoptotiques, une activité télomérase, une stimulation de l'activité des transporteurs membranaires, elles peuvent aussi entrer en phase de quiescence avec une résistance à l'hypoxie et de meilleures capacités de migration cellulaire et de survie même en absence d'adhésion (Ginestier *et al.*, 2007b).

1.5.2.2. Les propriétés spécifiques de la cellule souche cancéreuse

Les propriétés qui les spécifient des CS normales sont celles qui sont obtenues après des altérations génétiques. Les CSC se distinguent ainsi par la prolifération désordonnée suite à des dysfonctionnements de l'auto-renouvellement et d'une différenciation anormale. De plus, l'activité télomérase est régulièrement modifiée. Au moins c'est nécessaire d'avoir quatre des sept caractéristiques suivantes pour avoir une modification tumorale (Hanahan and Weinberg, 2000): La suffisance en facteurs de croissance, Une réplication illimitée,

L'échappement à l'apoptose, L'instabilité du génome, Le maintien de l'angiogenèse, La métastase et la résistance aux facteurs inhibiteurs de croissance.

1.5.3. Les voies de signalisation de l'auto-renouvellement des cellules souches

L'auto-renouvellement des cellules souches normales et cancéreuses est régulé par des voies de signalisation communes. Une mutation dans une des voies de l'homéostasie des cellules souches normales peut stimuler le développement de la tumeur. Des mutations accumulées dans les cellules souches cancéreuses peuvent activer de façon inappropriée les voies de l'auto-renouvellement comme les voies BMI-1, Notch, Wnt/B-caténine, ou encore Sonic hedgehog (Adolphe *et al.*, 2004).

1.5.3.1. BMI-1

BMI-1 polycomb ring finger oncogene est une protéine régulatrice importante pour l'autorenouvellement des CS normales et cancéreuses. Le locus INK4a est un composant essentiel de ce mécanisme d'auto-renouvellement. La dérégulation de cette voie peut conduire au cancer. Un déficit d'expression du BMI-1 dans les CSC a été montré (Lessard and Sauvageau, 2003).

1.5.3.2. Wnt/B-caténine

Wnt et la B-caténine sont des glycoprotéines riches en cystéines. Elles sont impliquées dans des voies incluant la formation des CS et le maintien de l'homéostasie à l'état adulte et dès l'embryogenèse. La B-caténine est impliquée dans la survie, l'adhérence et la prolifération des cellules leucémiques (Chung *et al.*, 2002). Une surexpression de la voie de signalisation Wnt est observée dans plusieurs cancers hématologiques et non hématologiques (Reya and Clevers, 2005; Reya *et al.*, 2001; Taipale and Beachy, 2001).

1.5.3.3. Notch

La voie de signalisation Notch est impliquée dans la communication intercellulaire. Elle est impliquée dans la détermination entre la division asymétrique et la différenciation (Fiúza and Arias, 2007). Elle peut jouer un rôle dans l'autorenouvellement des cellules souches et notamment cancéreuses.

1.5.3.4. Jun-B

Jun-B est un proto-oncogène qui régule le nombre de cellules souches. Sa surexpression induit un désordre de type myéloprolifératif (Guzman and Jordan, 2009).

1.5.3.5. Sonic hedgehog

La voie de signalisation Sonic Hedgehog intervient dans la survie, la croissance et la prolifération des cellules souches. Une surexpression de cette voie est observée dans plusieurs cancers (Adolphe *et al.*, 2004; Taipale and Beachy, 2001).

1.5.3.6. Les voies NF-KB et PI-3 kinase

Plusieurs études ont montré que les voies de signalisation NF- KB et PI-3 kinase ou la phosphatidylinositol-3-kinase jouent un rôle dramatique dans la survie des cellules souches cancéreuses. Une activation de la voie de signalisation NF-KB dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë a été observée. Or, les médicaments qui inhibent la voie NF-KB induisent l'apoptose des cellules souches leucémiques mais pas des cellules souches normales (Guzman *et al.*, 2001).

1.5.4. Niches des cellules souches cancéreuses

Le microenvironnement de la tumeur est similaire à la niche des cellules souches normales et on pense que le microenvironnement de la tumeur fournit une niche de cellules souches cancéreuses. Le microenvironnement est constitué de diverses cellules stromales, par exemple des cellules immunitaires et mésenchymateuses, un réseau vasculaire, des facteurs solubles et des composants d'une matrice extracellulaire (Borovski *et al.*, 2011). Ces microenvironnements jouent un rôle très important dans les interactions entre les cellules non malignes du microenvironnement et les CSC. Les CSC s'appuient sur ces niches pour leur auto-renouvellement et leur différenciation et pour le maintien de la croissance tumorale. La matrice extracellulaire pourrait également avoir un rôle protecteur pour les CSC contre la génotoxicité des interventions thérapeutiques (Chen *et al.*, 2013; Li and Latterra, 2012).

1.5.5. Méthodes d'Isolement des cellules souches normales et cancéreuses

Deux méthodes sont utilisées pour isoler les cellules souches. La première méthode en enrichissant une population cellulaire par l'identification des cellules de la «Side population». La seconde en utilisant des marqueurs membranaires spécifiques des cellules souches.

1.5.5.1. La méthode Side Population (SP)

Les populations SP sont enrichies en cellules primitives et indifférenciées. Cette méthode est une source de cellules souches d'utilisation nécessaire dans les situations dans lesquelles les marqueurs moléculaires des cellules souches ne sont pas identifiés.

Goodell et al. ont décrit une technique d'isolement d'une population SP par le colorant Hoechst 33342 qui se fixe à l'ADN selon le degré de prolifération (G0/G1). On peut isoler les cellules SP en cytométrie de flux après une coloration par le Hoechst 33342 car elles ne présentent pas la fluorescence caractéristique de ce colorant (Goodell *et al.*, 1996). Plusieurs tissus normaux et tumorales présentent des populations SP (Ginestier *et al.*, 2007a; Hadnagy *et al.*, 2006; Hirschmann-Jax *et al.*, 2004).

Les cellules souches cancéreuses présentent une sur-expression des transporteurs ATP qui expulsent les substances entrants dans les cellules plus spécifiquement le colorant Hoechst 33342.

Une population SP a été découverte dans les MCF7, lignée cellulaire humaine de cancer du sein. La population SP était la seule qui, après injection dans des souris NOD/SCID, pouvait re-former la tumeur (Kondo *et al.*, 2004).

1.5.5.2. Méthodes de marqueurs de surface

L'identification des CSC à partir d'une population hétérogène de cellules tumorales est généralement menée en utilisant le Tri des Cellules Activées par Fluorescence (TCAF). Jusqu'à plus récemment, les populations des CSC ont été identifiées par l'utilisation des Side Populations (SP) qui identifient donc un sous-ensemble cellulaire ayant une grande capacité à échapper aux traitements. Cette méthode a été largement dépassée par l'identification de marqueurs spécifiques utilisés pour identifier différentes cellules souches comme les marqueurs CD133, CD24, CD44 et l'activité de l'enzyme intracellulaire l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH1). Les marqueurs couramment utilisés pour la définition des CSC dans les tumeurs solides se trouvent dans le tableau1 (Kosovsky, 2012; Medema, 2013). Ces marqueurs ont une limitation car ils ne sont pas exprimés toujours et peuvent différer d'un patient à un autre.

Breast	Colon	Glioma	Liver	Lung	Melanoma	Ovarian	Pancreatic	Prostate
ALDH1	ABCB5	CD15	CD13	ABCG2	ABCB5	CD24	ABCG2	ALDH1
CD24	ALDH1	CD90	CD24	ALDH1	ALDH1	CD44	ALDH1	CD44
CD44	CD24	CD133	CD44	CD90	CD20	CD117	CD24	CD133
CD90	CD26	α 6integrin	CD90	CD117	CD133	CD133	CD44	α 6integrin
CD133	CD29	nestin	CD133	CD133	CD271		CD133	Trop2
α 6integrin	CD44						c-Met	
	CD133						CXCR4	
	CD166						Nestin	
	LGR5						Nodal- Activin	

Tableau 1: les marqueurs des CSC de plusieurs types de tumeurs (Medema, 2013).

1.5.6. Caractéristiques de la formation des sphères dans les CSC

La culture des cellules en conditions de faible adhérence, fournit un moyen pour obtenir des CSC sous forme de sphères. Une seule cellule souche ou une cellule progénitrice a la capacité de proliférer et de produire un sphéroïde, en s'appuyant sur sa capacité d'auto-renouvellement. Cette technique a été utilisée pour la première fois pour démontrer l'existence des cellules souches neuronales adultes (Reynolds and Weiss, 1992) et adoptée ultérieurement pour dériver des cellules souches et des cellules progénitrices à partir d'une variété de tissus normaux et néoplasiques (Gou *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013).

1.5.7. Résistance aux médicaments anticancéreux

La résistance aux médicaments cliniques peut se produire en raison des altérations de leur cibles, de leur inactivation / détoxification, de leur absorption réduite, de leur expulsion plus élevée et d'une dérégulation des voies apoptotiques. De nombreux modèles ont été suggérés pour expliquer l'origine de la résistance multiple aux médicaments: le modèle de la cellule souche cancéreuse résistant aux médicaments, le modèle de la cellule souche à résistance acquise et le modèle de résistance intrinsèque (Dean *et al.*, 2005; Gottesman, 2002; Moitra *et al.*, 2011).

Selon le modèle de la cellule souche cancéreuse résistant aux médicaments, après exposition au médicament, seules les cellules souches cancéreuses survivent. Ces cellules souches se divisent et rétablissent la population de la tumeur comportant des CSC et des cellules différenciées qui sont la descendance des CSC. Il a été démontré que les membranes

cellulaires et leurs constituants jouent un rôle très important dans la résistance aux médicaments dans les cellules cancéreuses, en particulier les cassettes triphosphate adénosine (ABC). Les transporteurs ABC réalisent le transport de substrats à travers des membranes biologiques contre un gradient de concentration, par hydrolyse de l'ATP. L'inactivation des pompes d'expulsion ABC pour rétablir la sensibilité aux médicaments des CSC est très prometteuse pour lutter contre différents cancers (Moitra *et al.*, 2011; Vinogradov and Wei, 2012). Les composés initiaux qui ont été utilisés expérimentalement à cet effet comprennent des médicaments tels que le verapamil et la cyclosporine, qui sont capables d'inhiber la pompe à efflux multidrogue ABCB1 (Dean *et al.*, 2005).

2. La méthionine

2.1. Le cycle de la méthionine

2.1.1. La SAM

La méthionine, un acide aminé soufré essentiel, joue un rôle central dans le métabolisme des monocarbone. Deux enzymes permettent la régénération partielle de la méthionine à partir de l'homocystéine : la méthionine synthase (MS) et la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT). La MS est l'enzyme ubiquitaire de la reméthylation de l'homocystéine. Son co-facteur est la vitamine B12. Elle retire un groupement méthyle du 5-méthyltetrahydrofolate (5-meTHF) et le cède à l'homocystéine qui est ainsi reméthylée pour donner la méthionine. D'autre part, la choline génère la bétaine grâce à la choline déshydrogénase, cette bétaine est utilisée comme donneur de méthyle par la BHMT pour la méthylation de l'homocystéine. La BHMT a une expression limitée dans l'organisme, elle se trouve dans les cellules hépatiques chez les mammifères et dans les reins chez les primates et les cochons, alors que la MS se trouve dans tous les tissus (Finkelstein and Martin, 2000). La méthionine est ensuite adénylée pour former la S-Adénosylméthionine (SAM) grâce à la méthionine adényltransférase (MAT) par une réaction ATP-dépendante (Figure 3). La synthèse de la SAM se fait dans toutes les cellules mais surtout dans les cellules hépatiques. Dans les cellules hépatiques, MAT1A, un gène spécifique du foie, synthétise la MAT. Il code une sous-unité ($\alpha 1$) qui forme un dimère (MAT III) ou un tétramère (MAT I). Dans les autres cellules, l'enzyme MAT est codée par le gène MAT2A. MAT2A code une sous-unité $\alpha 2$ et produit la MAT II. L'expression de MAT II est inhibée par des concentrations de SAM plus faibles que celles nécessaires pour inhiber MAT I/III. Le gène MAT2B, produit une sous-unité régulatrice (β) qui semble induire une inhibition de la MAT II par la SAM. (Avila *et al.*, 2002; Lu, 1998).

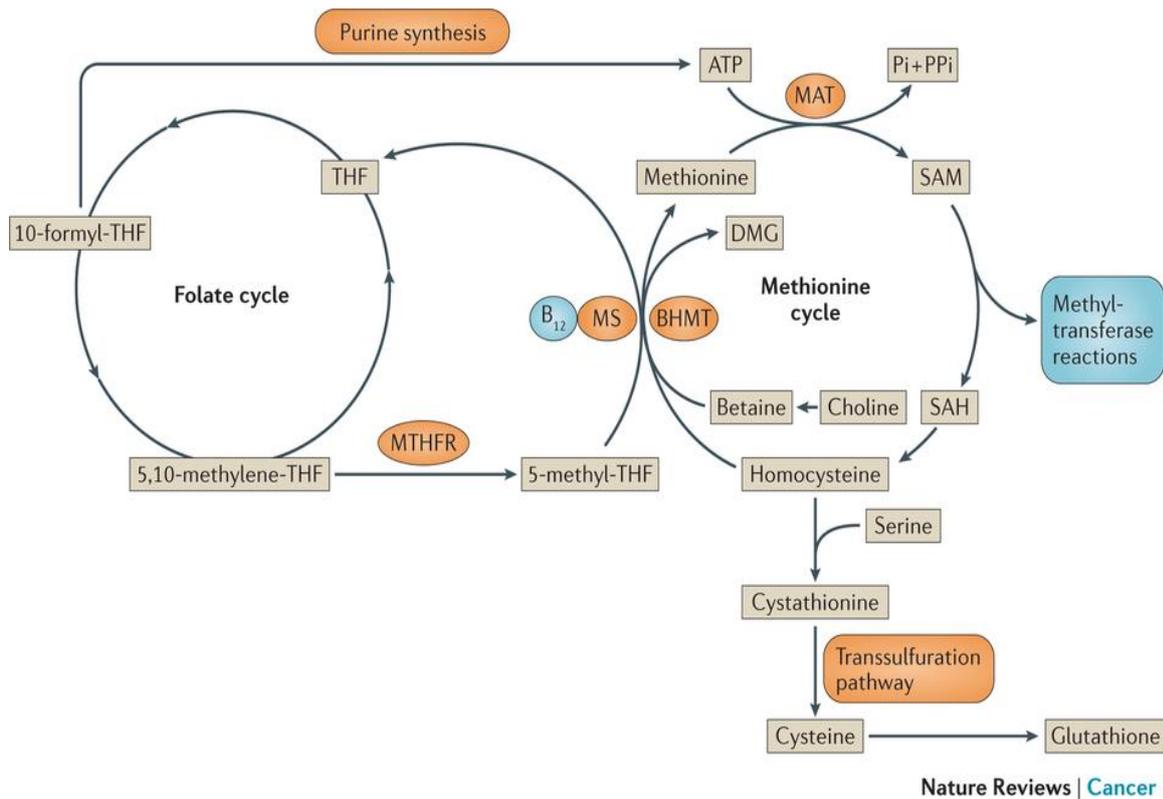


Figure 3: Le cycle de la méthionine (Yang and Vousden, 2016)

2.1.2. Les polyamines

Les polyamines comme la spermine et la spermidine, sont synthétisées à partir de la décarboxylation de la SAM par l'adénosylméthionine décarboxylase 1 (AMD1). Les polyamines, dérivées des acides aminés méthionine et arginine, ont plusieurs rôles biologiques; elles sont des régulateurs cellulaires capables d'inhiber ou de stimuler des enzymes, elles sont impliquées dans la régulation des gènes, la prolifération, la différenciation cellulaire, la transcription et l'apoptose (Pegg, 1988). La putrescine avec la SAM décarboxylée produit la spermidine qui, de nouveau avec la SAM décarboxylée et à partir des deux enzymes aminopropyltransférases, donne la spermine.

La putrescine est produite à partir de l'ornithine via l'ornithine décarboxylase. Cette enzyme est un facteur limitant de la production de polyamines. L'élévation de son activité est liée étroitement avec la formation des tumeurs (Auvinen *et al.*, 1992; Subhi *et al.*, 2003) (Figure 4).

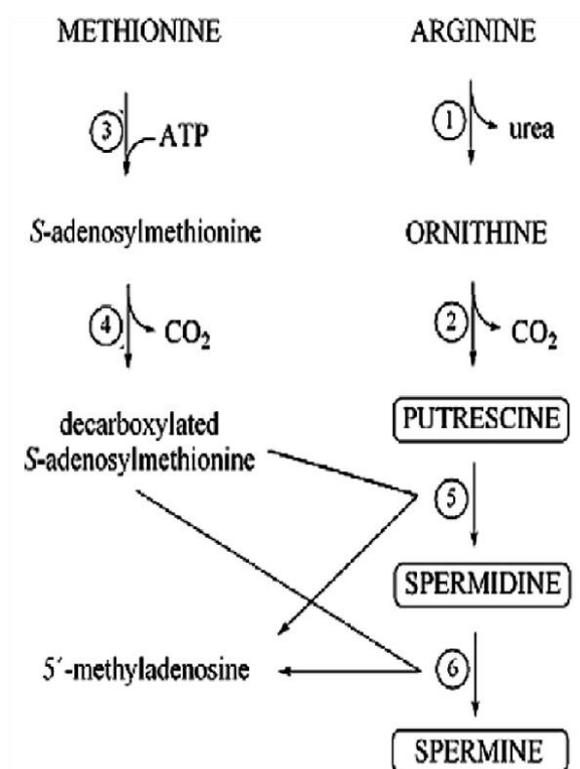


Figure 4: La voie de biosynthèse des polyamines (Kalac, 2014).

La méthionine est un donneur d'unités aminopropyliques pour la formation de spermidine et de spermine. Enzymes participantes: 1.arginase; 2.ornithine decarboxylase; 3. methionine adenosyltransferase; 4. S.adenosyl-L-methionine decarboxylase; 5.spermidine synthase; 6.spermine synthase.

2.1.3. La méthylation

Dans la SAM, l'ion sulfonium (3 atomes de carbone liés à un atome de soufre), chargé positivement, est propice aux attaques nucléophiles. Il comporte un groupement méthyle. Les attaques nucléophiles conduisent au transfert du groupement méthyle lors de plusieurs réactions de transméthylation. Plus de 40 méthyltransférases utilisent la SAM. La SAM joue un rôle important de donneur de groupement méthyle à l'ADN, sur le carbone 5 du cycle pyrimidine de résidus cytosines. L'addition du groupement méthyle sur une cytosine est réalisée par les ADN méthyltransférases (Dnmts). Ces Dnmts sont composées de cinq membres: Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3L et Dnmt2. Toutefois, il a été démontré que Dnmt2 a une activité ADN méthyltransférase plus faible et elle serait impliquée plutôt dans la méthylation de l'ARNt (Worm and Guldborg, 2002).

La SAM est impliquée aussi dans la méthylation de protéines et des ARN, dans la biosynthèse de composés tels que la créatine, dans la transformation de la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine qui peut ensuite être transformée en choline qui, à son tour, donne la bétaine utilisée par la BHMT pour régénérer la méthionine. Le produit des réactions catalysées par les méthyltransférases est la S-adénylhomocystéine. La SAH sera ensuite hydrolysée par la SAH-hydrolase en adénosine et en homocystéine. L'adénosine ensuite sera dégradée en inosine et l'homocystéine peut être métabolisée par la voie de transsulfuration.

2.1.4. La voie de la transsulfuration

La voie de transsulfuration est la seule voie de recyclage de l'homocystéine de façon irréversible. La cystationine β -synthase ajoute la molécule d'homocystéine à la molécule de serine pour donner de cystathionine. Cette réaction nécessite la présence de la vitamine B6 comme cofacteur. La cystathionine est ensuite transformée par la γ -cystathionase (ou cystathionine γ -lyase), aussi dépendante de la vitamine B6, en cystéine et en homosérine désaminée en α -cétobutyrate. Notamment, la cystéine est le précurseur du glutathion qui, par son action anti-oxydante, contribue au maintien du statut redox cellulaire.

Cette voie de transsulfuration est principalement présente dans les tissus à forte demande en glutathion comme le foie, le cerveau, les reins, les ovaires et le muscle (Dringen and Hamprecht, 1999). Elle est absente du cœur, des poumons et de la rate (Finkelstein, 1998) d'où la nécessité d'un apport exogène en cystéine.

2.2. Le cycle des folates

La méthionine synthase reméthyle l'homocystéine en méthionine. Cette réaction nécessite la présence du meTHF produit dans le cycle des folates grâce à l'enzyme 5,10 méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR). Le 5-meTHF cède son groupement méthyle à l'homocystéine pour donner le tétrahydrofolate (THF). La serine hydroxyméthyle transférase transforme le THF en 5,10 méthylène THF en utilisant le coenzyme pyridoxal phosphate (vitamine B6) : elle retire un groupement méthyle à la sérine, qui est ainsi transformée en glycine, et le cède au THF pour donner le 5,10 méthylène tétrahydrofolate. Ce dernier peut donner directement le meTHF grâce à l'action de la MTHFR mais il peut aussi être transformé en 7,8-dihydrofolate (7,8-DHF) par la thymidilate synthase. L'action de la

thymidilate synthase gène le dTMP à partir du dUMP. La dihydrofolate réductase régène le THF à partir du 7,8-dihydrofolate et de NADPH,H+ (Figure 15).

2.3. Autres voies de la synthèse de la méthionine

D'autres enzymes permettent la synthèse de la méthionine à partir de la SAM. Elles ont été montrées au début chez les bactéries et chez les levures comme *S.cerevisiae* (Cornell *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2000). Ensuite, elles ont été montrées dans les foies de rats et dans les lignées cellulaires humaines (Backlund *et al.*, 1982; Backlund and Smith, 1981; Trackman and Abeles, 1983).

2.3.1. Par la SAM décarboxylée

La SAM décarboxylée réagit avec la putrescine pour donner la 5'-méthylthioadénosine (MTA) et la spermidine. La MTA permettra la synthèse ultérieurement de méthionine (Cornell *et al.*, 1996).

Dans ce cycle, la MTA, sous l'action enzymatique de la méthylthioadénosine phosphorylase, est phosphorylée en 5'-méthylthioribose-1-phosphate et libère en même temps l'adénine. Cette adénine réagit avec l'adénosine phosphoribosyltransférase pour donner l'AMP (Batova *et al.*, 1999). Le 5'-méthylthioribose 1-phosphate donne le 5'-méthylthioribulose 1-phosphate puis l'acide 4-méthylthio-2 oxobutanoïque qui se transforme en méthionine en présence soit de l'asparagine ou de la glutamine (Figure 5).

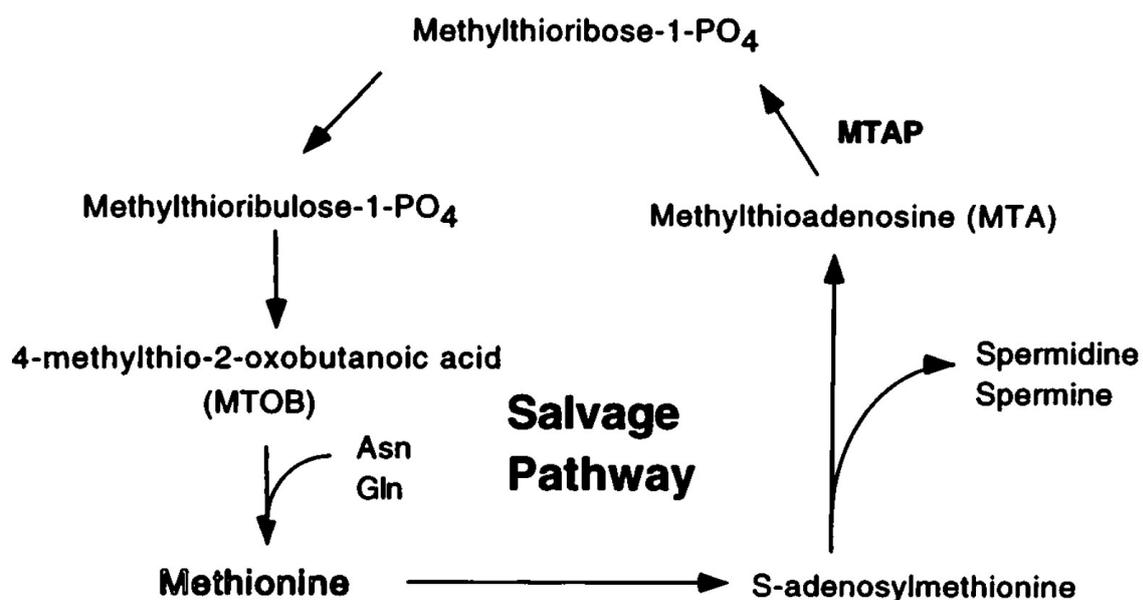


Figure 5: Voie de sauvetage de la méthionine (Tang *et al.*, 2000a)

Plusieurs études ont montré l'importance de cette voie de secours en comparant la croissance de différentes lignées cellulaires dans un milieu contenant seulement la 5'-méthylthioadénosine (MTA) ou dans un milieu contenant seulement la méthionine. Dans le milieu avec MTA uniquement, la croissance cellulaire était complètement inhibée ou ralentie atteignant au maximum 30% de la prolifération observée en conditions normales c'est à dire dans le milieu avec méthionine. Ces variations pourraient être expliquées par des besoins différents en méthionine ou bien par des voies différentes de transport de la MTA, ou par des accumulations de MTA qui est un facteur d'inhibition de la prolifération cellulaire (Backlund *et al.*, 1982; Kubota *et al.*, 1983; Tisdale, 1983). Cette voie de secours est connue pour être importante dans les cellules cancéreuses à forte production de polyamines (Backlund *et al.*, 1982; Dykstra and Herbst, 1965; Fillingame and Morris, 1973; Hoffman, 1985).

2.3.2. Par la SAM

Chez *S. cerevisiae*, la voie de secours de la méthionine comporte deux autres enzymes : Sam4 (AdoMet- homocystéine transférase) et Mht1 (S-méthylméthionine- homocystéine méthyltransférase). Ces enzymes peuvent méthyler l'homocystéine en méthionine avec comme co-substrat la SAM pour Sam 4 ou peuvent méthyler l'homocystéine en deux molécules de méthionine avec comme co-substrat la S- méthylméthionine pour Mht1. Les auteurs retrouvent des séquences similaires de ces deux gènes chez la drosophile et considèrent que ces deux protéines sont exprimées aussi chez tous les eucaryotes (Thomas *et al.*, 2000) (Figure 6).

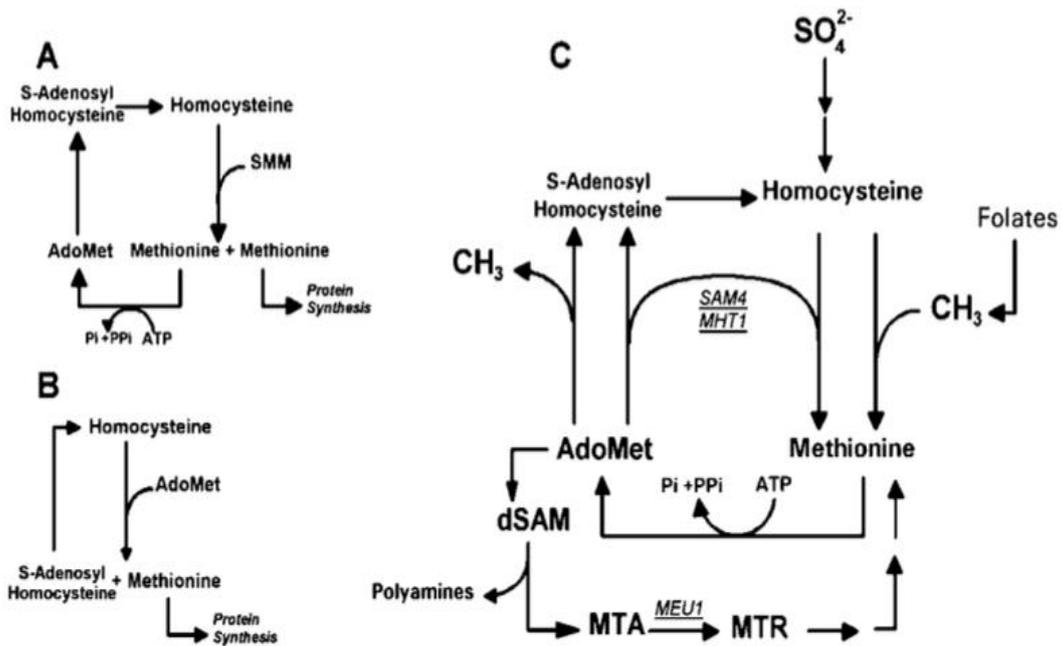


Figure 6: les différentes réactions de biosynthèse de la méthionine chez la levure.

A. Synthèse de la méthionine dépendante d'AdoMet. Pi, orthophosphate inorganique; PPi, pyrophosphate inorganique. B. synthèse de la méthionine dépendante de SMM. C. le recyclage des sous-produits d'utilisation de l'AdoMet. (Thomas et al., 2000)

2.4. Régulation du cycle de la méthionine

Plusieurs régulations interviennent dans le métabolisme de la méthionine et de ses cycles associés. Parmi ces régulations on cite :

2.4.1. Le rapport SAM/SAH

Quand le ratio SAM/SAH est élevé, la méthyltétrahydrofolate réductase (MTHFR) est inhibée. Le taux de méthyltétrahydrofolate est faible et l'homocystéine est dégradée par la voie de transsulfuration. Quand la concentration en SAM augmente, la méthylation de l'homocystéine est diminuée et la transsulfuration est activée.

Si ce ratio est faible, cela montre un besoin de synthèse plus élevée de SAM et par conséquent l'inhibition de la MTHFR est levée et le méthyltétrahydrofolate est produit pour soutenir la réaction de la méthionine synthase. MTHFR est allostériquement régulée par le ratio SAM/SAH, la SAM étant inhibiteur et la SAH étant compétiteur de la SAM en se liant à la réductase mais n'agissant pas elle-même comme un inhibiteur de la MTHFR (Kutzbach and Stokstad, 1971).

Dans les cellules hépatiques, la glycine N méthyltransférase est une enzyme capable de convertir la glycine en sarcosine en présence de SAM. Cette enzyme peut être inhibée par le 5-méthyltétrahydrofolate (Wagner *et al.*, 1989) mais pas par la SAM. Elle permet donc de réguler le ratio SAM/SAH (Mato *et al.*, 1997).

Par contre, dans les cellules non hépatiques, le taux de SAM est constant alors que la concentration de SAH varie plus. Donc le ratio SAM/SAH varie essentiellement par le taux de SAH (Finkelstein, 1998).

La majorité des méthyltransférases sont inhibées par l'accumulation de SAH comme par exemple, les DNMTs (Hirata *et al.*, 1980; Hoffman *et al.*, 1979; Kredich and Hershfield, 1979; Kredich and Martin, 1977).

2.4.2. La MTA

La méthylthioadénosine inhibe l'utilisation de SAM sans inhiber la dégradation de la SAH. Dans les cellules de rein de rat, la méthylation de l'ADN n'est pas inhibée par de faibles concentrations de MTA (Dante *et al.*, 1983). In vitro, La MTA inhibe la SAH hydrolase quelque soit la concentration de SAH (Ferro *et al.*, 1981; Fox *et al.*, 1982). Toutefois, si l'on considère la faible concentration de MTA par rapport à la concentration de SAH, il est probable que, *in vivo*, cette régulation du cycle de la méthionine par la MTA existe seulement dans les cellules cancéreuses et non dans les cellules normales (Williams-Ashman *et al.*, 1982).

2.4.3. Régulation de la méthionine synthase

2.4.3.1. Méthionine synthase réductase

Durant la méthylation de l'homocystéine, le cofacteur (vitamine B12) passe de la forme méthylcobalamine à la forme Cobalamine I qui est un réducteur fort. Cependant, en présence d'oxygène, la forme Cobalamine I est parfois oxydée en une forme inactive Cobalamine II. Pour revenir à la forme active, une méthylation réductrice est nécessaire dans laquelle le groupement méthyle est fourni par la SAM et le transfert d'électron a été premièrement montré chez E. Coli comme étant assuré par deux flavoprotéines, la flavodoxine fixant le FMN (Matthews, 1998) et la NADPH flavodoxine (ou ferredoxine) oxydoréductase possédant des sites de fixation FAD/NADPH (Olteanu and Banerjee, 2001) (Figure 7).

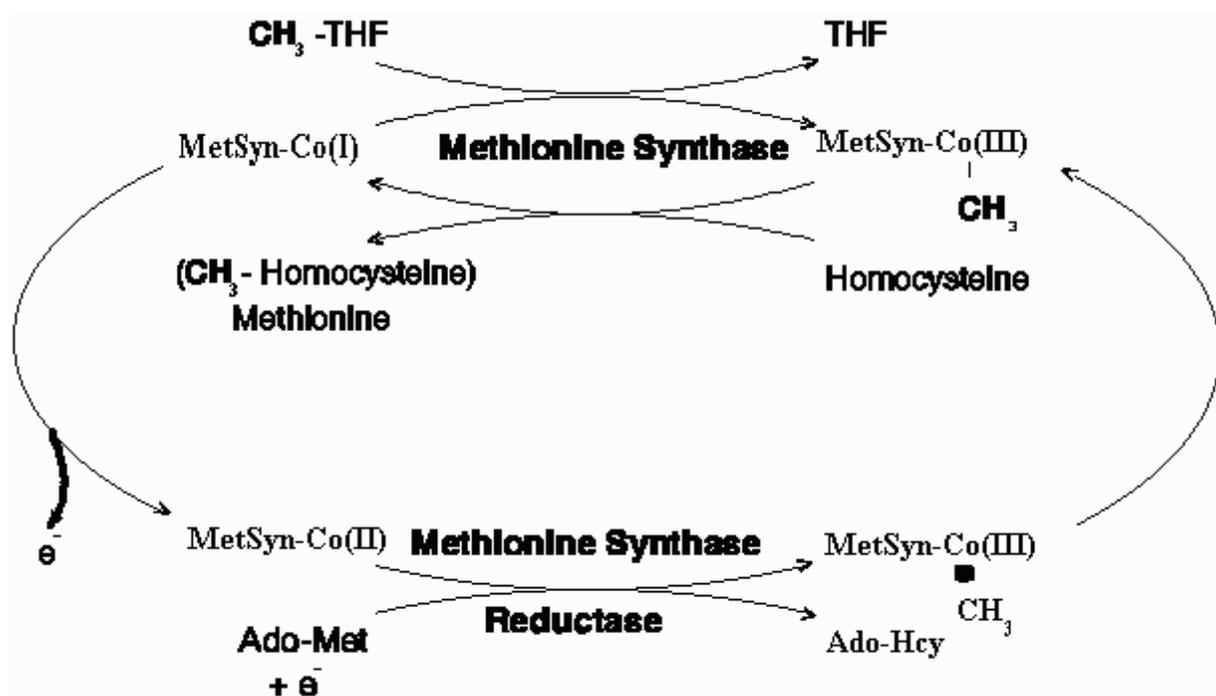


Figure 7: Mode d'action de la méthionine synthase réductase (Leclerc *et al.*, 1998)

Mécanisme proposé du fonctionnement de la méthionine synthase associée à son cofacteur la vitamine B12 (MS-CO). Cette enzyme en temps normal oscille entre la forme Cob(I)alamine (CO(I)) et la forme méthylée Cob(III)alamine (Co(III)). Mais quand la forme (Co(I)) est oxydée en forme inactive Cob(II)alamine (CO(II)) cela nécessite la méthylation réductrice chez E.Coli par deux flavoprotéines et chez l'homme par la méthionine synthase réductase qui utilise comme donneur d'électron le FMN, le FAD et le NADPH.

Ensuite, un modèle du système de réduction a été proposé chez l'homme avec les trois sites de fixation (pour le FMN, le FAD, et le NADPH) sur la même enzyme qui a été dénommée méthionine synthase réductase (MSR) (Leclerc *et al.*, 1998) (Figure 8).

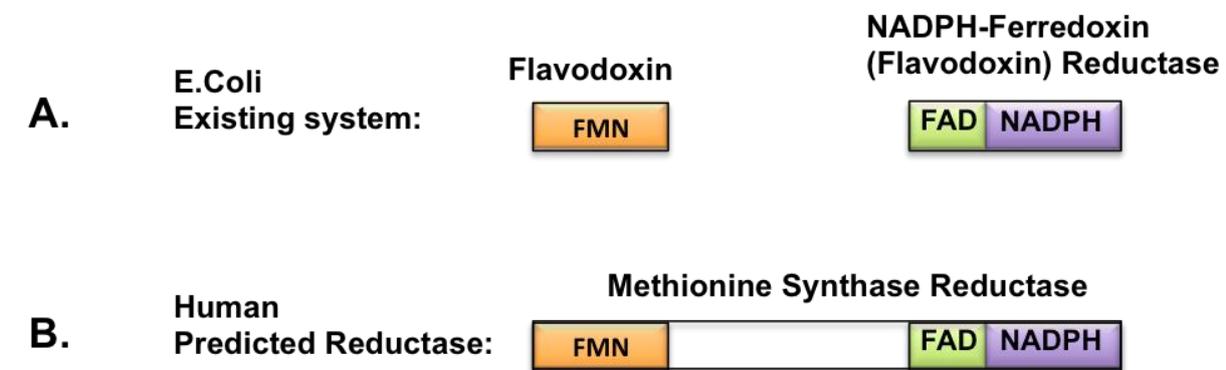


Figure 8: Structure de la méthionine synthase réductase (Leclerc *et al.*, 1998)

Enzymes impliqués dans la réduction de la méthionine synthase. Haut : le système à deux flavoprotéines impliqué dans l'activation réductrice de la méthionine synthase à base de cobalamine dans *Escherichia coli*. Les sites de fixation FMN et FAD/NADPH sont séparés sur les deux enzymes. Bas : modèle proposé par Leclerc *et al.* du système de réduction " un gène- un enzyme " pour la méthionine synthase de mammifères avec les trois sites de fixation sur la même enzyme

La MSR possède une certaine similitude avec la cytochrome P450 réductase humaine et avec les deux enzymes du système réducteur de la méthionine synthase d'*E.coli*. Dans un groupe de patients CblE déficients en méthionine synthase (MS), des mutations ont été identifiées dans la MSR responsables d'une dérégulation du système d'activation réductrice de la méthionine synthase (Gulati *et al.*, 1999). Ultérieurement, la MSR a été purifiée à partir de la séquence publiée par Leclerc *et al.* (Leclerc *et al.*, 1998). Son activité est restée inchangée si elle était mesurée en présence de vitamine B12 et de DTT ou en présence de méthionine synthase réductase. La méthionine synthase réductase (MSR) est capable de maintenir l'activité de la MS en présence de NADPH.

De même, il a été démontré que l'activité de la MS porcine est restaurée en présence du cytochrome b5 et du cytochrome P450 réductase, d'où la conclusion que le cytochrome b5 soluble est une des protéines activatrices de la MS (Chen and Banerjee, 1998). Ce modèle b5/P450 réductase a été proposé comme étant une deuxième voie d'activation de la MS.

Ultérieurement, l'enzyme NR1 (Novel Reductase 1) dont le rôle était inconnu, a été définie comme étant une réductase contenant les domaines de fixation de la FMN, du FAD et du NADPH avec une séquence semblable à celle de la cytochrome réductase P450 et à celle de la MSR. Il a été démontré que NR1 est capable d'activer la MS en présence du cytochrome b5 mais pas en son absence. Cependant, cette voie d'activation catalytique de la MS reste mineure physiologiquement par rapport à la MSR.

De ce fait, la SAM est considérée comme un facteur de régulation de l'activité de la méthionine synthase surtout qu'elle intervient au niveau de la réduction du couple cobalamine/méthionine synthase (Billings *et al.*, 1981).

2.4.3.2. Régulation par les polyamines

Les polyamines sont des régulateurs cellulaires et jouent un rôle dans la régulation de la MS. La MS des cellules hépatiques de rat peut être stimulée par les polyamines, et plus précisément par la spermine (Kenyon *et al.*, 1996). La stimulation de la méthionine synthase par les polyamines aide à la division cellulaire. La concentration de polyamines dans les cellules cancéreuses est plus forte que dans les cellules normales, ce qui peut stimuler encore plus la méthionine synthase (Kenyon *et al.*, 1996).

Cependant, l'ornithine décarboxylase, la première enzyme de la synthèse des polyamines, est inhibée par la voie de secours de la méthionine. Une augmentation de la synthèse de putrescine et de l'activité de l'ornithine décarboxylase a été montrée chez *Saccharomyces cerevisiae*, quand la méthylthioadénosine phosphorylase était inactivée suite à une mutation (Christopher *et al.*, 2002; Subhi *et al.*, 2003) ou lorsque l'acide 4-méthylthio-2-oxobutanoïque (dernier produit avant la méthionine) est ajouté dans le milieu. De même, ces résultats ont été montrés dans les cellules MCF-7 (lignée cellulaire d'adénocarcinome du sein) et les cellules MIAPaca-2 (lignée cellulaire d'adénocarcinome pancréatique) dans lesquelles l'expression de la méthylthioadénosine phosphorylase est inhibée (Christopher *et al.*, 2002; Subhi *et al.*, 2003). L'ornithine décarboxylase, qui intervient dans la transformation cellulaire, fait partie de la famille des proto-oncogènes cellulaires (Auvinen *et al.*, 1992). Elle est inhibée par la SAM décarboxylase (Gupta *et al.*, 2001; Subhi *et al.*, 2003).

3.4.3.3. Par la méthionine

Il a été montré que la méthionine inhibe l'activité méthionine synthase (Grzelakowska-Sztabert and Landman-Balinska, 1976; Tautt *et al.*, 1982). Le remplacement de la méthionine

par l'homocystéine et la vitamine B12 dans le milieu de culture induit une augmentation de l'activité de la méthionine synthase (Tautt *et al.*, 1982) mais cette augmentation est bloquée par la puromycine (Kamely *et al.*, 1973). Donc l'inhibition de la méthionine synthase par la méthionine pourrait être due en partie à l'arrêt de la traduction.

2.4.3.4. Maladies de dysfonctionnement de la méthionine synthase

Plusieurs maladies sont reliées à la dérégulation de la méthionine synthase. Elle induit une hyperhomocystéinémie, facteur de risque dans les maladies cardio-vasculaires, et peut également induire un défaut dans la fermeture du tube neural de l'embryon (Demuth *et al.*, 1999; Gueant *et al.*, 2003).

Une maladie autosomale récessive du métabolisme des folates et des cobalamines induit la déficience fonctionnelle de la MS. Deux groupes différents de cette déficience touchent deux gènes distincts mais avec les mêmes symptômes. Le premier c'est « le groupe de complémentation *CblG* » avec une MS non fonctionnelle, le deuxième groupe est « le groupe de complémentation *CblE* » avec une déficience de la méthionine synthase réductase mais où la méthionine synthase est toujours fonctionnelle. Ces deux groupes de complémentation présentent une hyperhomocystéinémie, une homocystinurie, une hypométhioninémie et une anémie mégaloblastique (Harding *et al.*, 1997; Watkins and Rosenblatt, 1989).

3. La vitamine B12 ou Cobalamine

3.1. Définition

La vitamine B12, ou cobalamine (Cbl), est une vitamine hydrosoluble. Elle est un nutriment essentiel qui fonctionne comme une coenzyme dans deux processus métaboliques : la conversion de la méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA par la méthylmalonylCoA mutase (MCM) au niveau de la mitochondrie et la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MS) au niveau du cytosol des cellules. (Rafnsson *et al.*, 2011). A l'état naturel, la vitamine B12 existe sous forme de cristaux rouge foncé, due au cobalt. Elle a une structure chimique proche de l'hème, l'atome central de fer étant remplacé par un atome de cobalt, d'où son nom.

3.2. Histoire

George Whipple, George Minot et William Murphy ont montré en 1926 que des extraits de foie sont capables de corriger l'anémie pernicieuse. En 1948, Karl Folker du laboratoire Merck et Lester Smith du laboratoire Glaxo ont isolé la vitamine B12 à partir du foie. Ceci a permis l'ingestion de quelques microgrammes d'un composé cristallin rouge (Rickes *et al.*, 1948; Smith, 1948) au lieu de plusieurs grammes de foie cru ce qui a bouleversé la thérapie de l'anémie. De plus, les transporteurs liant la B12 ont été recherchés. Parmi ces transporteurs: le facteur intrinsèque (IF), décrit par Castle et purifié par R. Gräsbeck en 1965 (Grasbeck *et al.*, 1965), un accepteur de la B12 et qui est indispensable à l'absorption de la B12.

3.3. Nutrition

La vitamine B12 est principalement présente dans les aliments d'origine animale comme le foie, la viande, les volailles, le jaune d'œuf, les poissons et les crustacés. L'organisme humain ne synthétisant pas la vitamine B12, l'apport alimentaire est donc indispensable. Les apports conseillés en vitamine B12 sont très faibles, environ 3 microgrammes par jour chez l'adulte. Ces besoins sont variables selon les périodes de la vie. Le tableau suivant récapitule les apports nutritionnels conseillés pour les différentes catégories d'âge.

Tableau 2: Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B12 pour la population française. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec & Doc.

Catégorie	ANC 2001 ($\mu\text{g}/\text{J}$)
Nourrissons	0.5
Enfants de 1-3 ans	0.8
Enfants de 4-6 ans	1.1
Enfants de 7-9 ans	1.4
Enfants de 10-12 ans	1.9
Adolescents de 13-15 ans	2.3
Adolescents de 15-19 ans	2.4
Homme adultes	2.4
Femmes adultes	2.4
Personne âgée de plus e 75 ans	3
Femmes enceintes	2.6
Femmes qui allaitent	2.8

3.4. Structure chimique

La vitamine B12 est une molécule organométallique volumineuse. Chimiquement, elle a une structure proche de l'hème mais l'atome central de fer est remplacé par un atome de cobalt. L'atome de cobalt peut être tri-, bi- ou monovalent ce qui correspond à 3 niveaux d'oxydation: Cob(I)alamine, Cob(II)alamine, Cob(III)alamine. La cobalamine appartient à une famille de composés appelés corrinoïdes. La molécule de corrinoïde comprends trois parties (Figure 9) : un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole (DMB) et l'autre en position β est constituée d'un radical anionique variable X qui détermine le nom du composé vitaminique, CN pour cyanocobalamine (forme circulante), OH pour hydroxocobalamine (forme circulante), CH_3 pour méthylcobalamine (cofacteur de réactions de reméthylation en particulier dans la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine) et 5'd Ado pour 5'- désoxyadénosylcobalamine (cofacteur de la méthylmalonyl CoA mutase).

Cobalamin (vitamin B12)

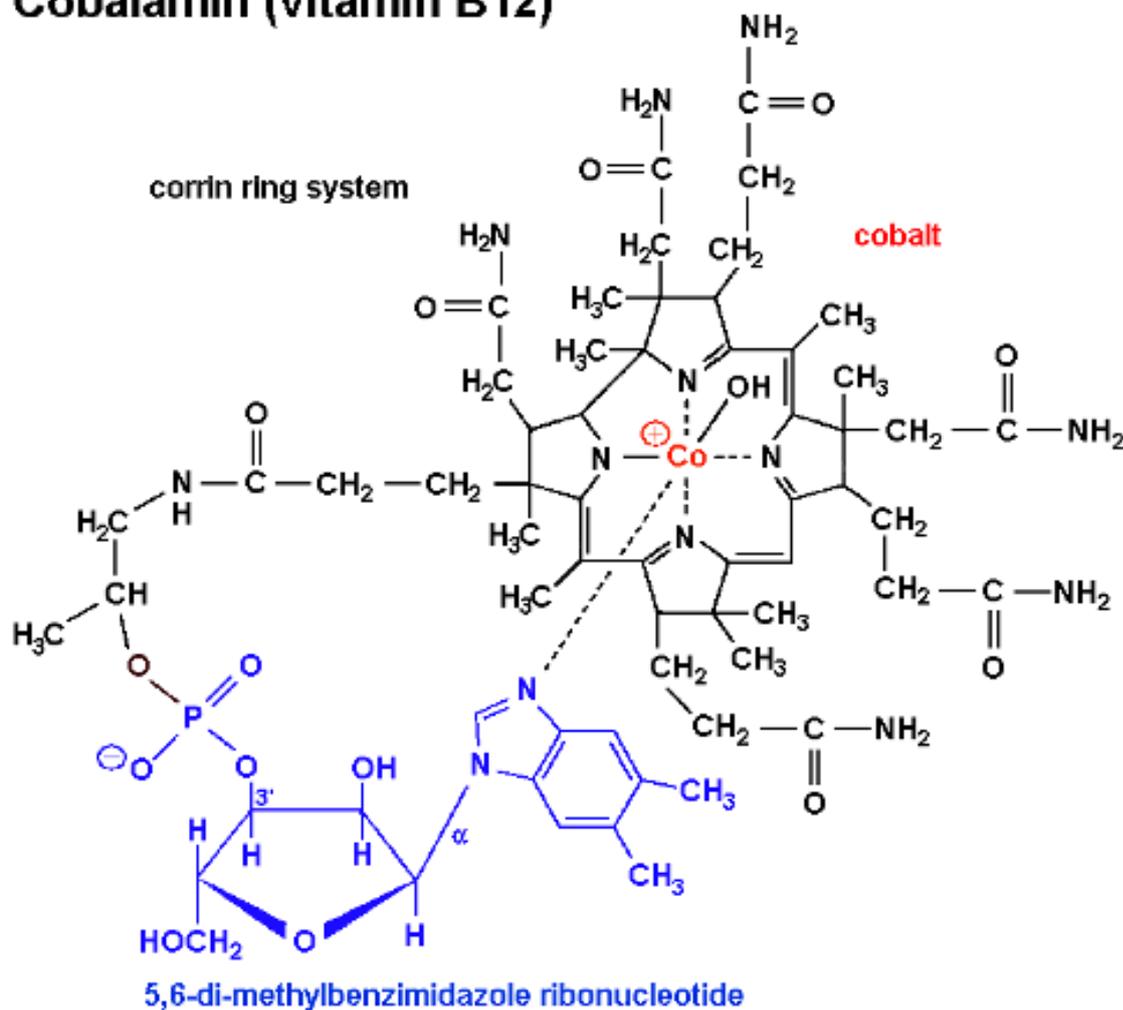


Figure 9: la vitamine B12 ou cobalamine (Cbl) et ses différentes formes

Le noyau corrine est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrroles ainsi qu'à un ligand anionique (- R), dont la nature permettra de définir :

- R = - CN cyanocobalamine
- R = -OH hydroxocobalamine
- R = - CH₃ méthylcobalamine
- R = -5'd Ado 5'-désoxyadenosyl cobalamine

3.5. Absorption

Le processus d'absorption de la cobalamine est complexe et nécessite l'intervention de plusieurs protéines capable de lier la vitamine B12 (Figure 10).

Au moment de l'ingestion des aliments, la majorité des Cbl sont sous forme d'AdoCbl et de

MeCbl, attachées aux protéines alimentaires. Les haptocorrines salivaires prennent en charge les Cbl libres dans la bouche. Ensuite, dans le milieu acide de l'estomac, les sécrétions chlorohydropeptiques libèrent la Cbl des protéines alimentaires. La Cbl se lie plutôt à l'haptocorrine jusqu'à ce que les protéases pancréatiques la détruisent au niveau duodénal (Russell-Jones and Alpers, 1999). De nouveau libre dans un environnement plus alcalin, la Cbl va pouvoir se complexer au facteur intrinsèque (IF) sécrété par les cellules pariétales de l'estomac (Nicolas and Gueant, 1994). Ceci va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau iléal (Ganesan *et al.*, 2002). Le complexe IF-vitamine B12 va se fixer sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'iléon appelé cubam formé de la cubiline associée à la protéine amnionless (Gueant *et al.*, 1988). Une fois internalisé, le complexe B12-IF va traverser la paroi du tube digestif par endocytose et l'IF est dégradé dans l'entérocyte libérant ainsi la vitamine B12. Pour pénétrer dans le cytoplasme, la B12 traverse la membrane lysosomale par un processus impliquant les protéines LMBD1 et ABCD4 (ATP-binding cassette (ABC) transporter D4), localisée au niveau de la membrane du lysosome (Coelho *et al.*, 2012; Rutsch *et al.*, 2009). Dans le sang, la vitamine B12 est sous une forme liée à une protéine : la transcobalamine II (TCII) (Nicolas and Gueant, 1994; Seetharam *et al.*, 1999; Seetharam and Li, 2000). Seulement 10-30% de la cobalamine se lie à la TCII, alors que la majorité se lie à l'haptocorrine (Fernandes-Costa and Metz, 1982). A forte dose, la cobalamine peut diffuser de façon passive à travers les muqueuses buccale, gastrique, jéjunale et moins de 1 % de la dose ingérée peut donc apparaître dans la circulation après quelques minutes.

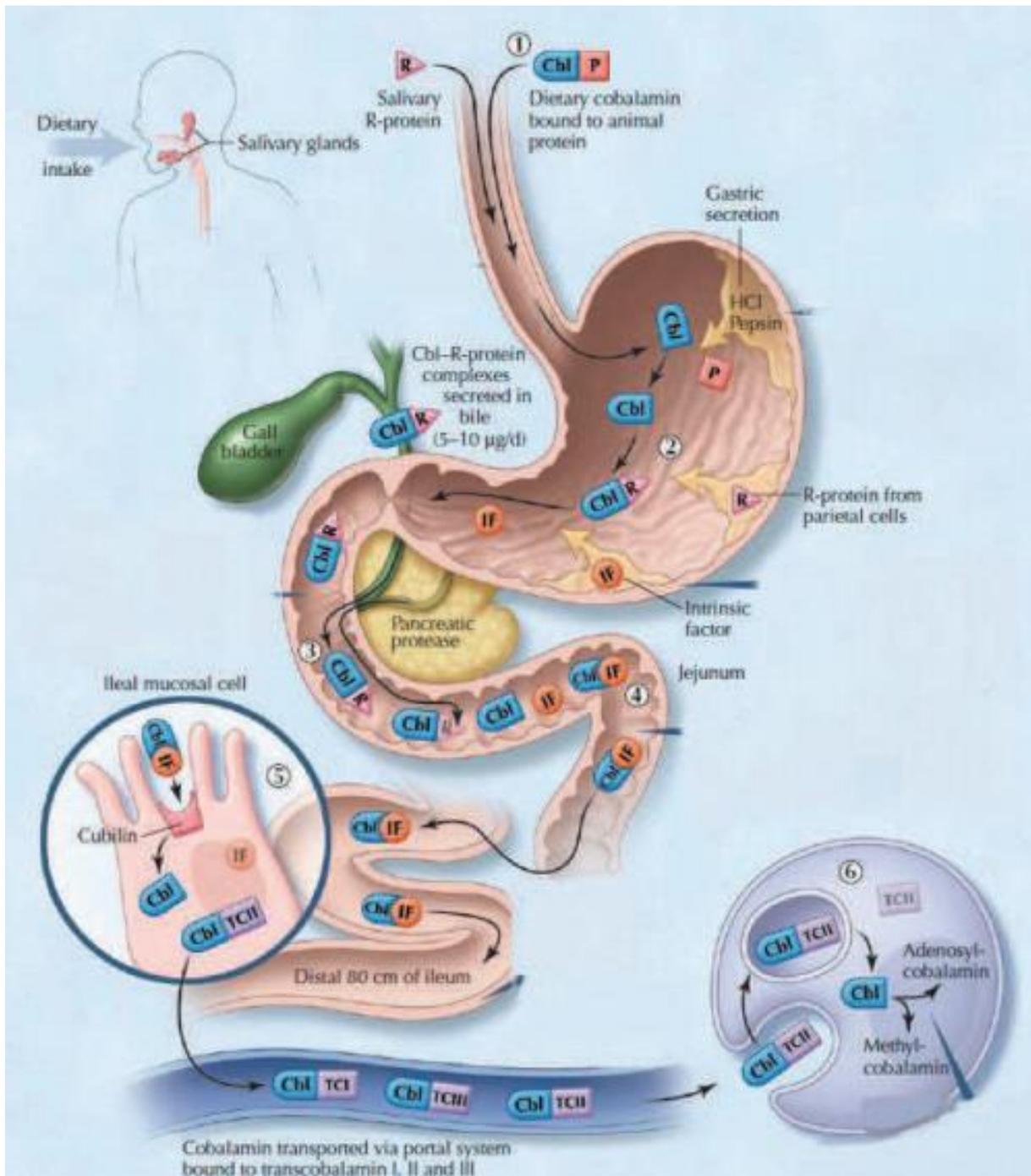


Figure 10: Mécanisme d'absorption de la vitamine B12 (Andres *et al.*, 2004)

R : haptocorrine ; *IF* : facteur intrinsèque ; *Cbl* : cobalamine ; *TC2* : transcobalamine II.

3.6. Transport

Dans le sang, la vitamine B12 est liée à des protéines de transport spécifiques, la transcobalamine II ou l'haptocorrine, qui assurent l'internalisation dans les cellules grâce à un phénomène d'endocytose qui a lieu au niveau des récepteurs membranaires (Seetharam *et al.*, 1999). Ensuite, La Cbl qui est liée à l'haptocorrine, est absorbée par les hépatocytes via le récepteur de l'asialoglycoprotéine.

Le complexe Cbl/ TCII, circule dans le sang, se fixe par sa partie protéique à un récepteur d'endocytose membranaire spécifique, le récepteur mégaline pour les reins et le CD320 pour le foie et les autres tissus (Cho *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2012) et entre dans la cellule. La partie protéique (transcobalamine) est dégradée dans le lysosome et cela libère la vitamine B12 (Lildballe *et al.*, 2012). Cette dernière quitte alors les lysosomes et se transforme en coenzymes actifs :

(A) Méthylcobalamine (MeCbl), coenzyme de la méthionine synthase, au niveau du cytoplasme.

(B) Adénosylcobalamine (AdoCbl), coenzyme de la méthylmalonyl –CoA mutase, au niveau de la mitochondrie.

3.7. Stockage et élimination

La vitamine B12 est stockée principalement dans la rate, le foie et le cœur. Dans le foie on trouve environ 50% du stock ou 2-3 mg (Le Grusse and Watier, 1993) ce qui correspond à une réserve pour l'organisme pendant 3-5 ans puisque les besoins quotidiens de vitamine B12 ne constituent que 3 à 4 µg/jour. L'élimination de la vitamine B12 chez l'homme est assurée par la voie fécale, la bile et les urines, et varie de 2 à 5 µg/jour (McDowell, 2000).

3.8. Métabolisme cellulaire de la cobalamine

La cobalamine est convertie en deux dérivés biologiquement actifs, AdoCbl et MeCbl.

Le métabolisme intracellulaire de la cobalamine exige une étape obligatoire de libération de la cobalamine par la dégradation lysosomale de la TCII. Une fois la cobalamine libérée, elle est livrée à la cobalamine adénosyltransférase dans la mitochondrie (Yamanishi *et al.*, 2005) ou à la méthionine synthase dans le cytoplasme (Kapadia, 1995).

Dans la mitochondrie, la cobalamine adénosyltransférase avec une cobalamine réductase, catalyse la réduction de la cobalamine en AdoCbl. L'AdoCbl, coenzyme de la méthylmalonyl-

CoA mutase aide à la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA (Krautler, 2005). Ce dernier va entrer dans le cycle de Krebs et va intervenir dans la néoglucogenèse. Le fait de bloquer la méthylmalonyl-CoA mutase à cause d'un déficit en cobalamine, entraîne une acidurie méthylmalonique (Grutzner *et al.*, 2013).

Dans le cytoplasme, le N5-méthyltétrahydrofolate (N5-MeTHF) donne son groupement méthyle à la Cbl pour donner la MeCbl et le tétrahydrofolate (THF). Ensuite, la MeCbl, grâce à la méthionine synthase (MS), transfère son groupement méthyle vers l'homocystéine pour redonner la méthionine. Dans cette réaction, le MeCbl est convertie en cob(I)alamine. La carence en B12 induit une augmentation du taux du N5-MeTHF et donc une diminution du THF ce qui réduit la synthèse de thymidylate nécessaire à la synthèse d'ADN.

3.9. Les troubles du métabolisme de la vitamine B12

Le métabolisme intracellulaire de la cobalamine peut être affecté par des mutations de gènes et donc par 9 défauts génétiques, CblA, CblB, CblC, CblD, CblE, CblF, CblG, CblJ et Mut. (Figure 11). Ces mutations peuvent être classées en trois groupes:

Défauts génétiques touchant seulement la synthèse de l'AdoCbl: défauts de gènes MMAA (CblA) et MMAB (CblB). Ces défauts provoquent une acidurie méthylmalonique. La protéine MMAA joue un rôle important dans le transfert d'AdoCbl de la cobalamine adénosyltransférase vers la méthylmalonyl CoA mutase et elle est nécessaire pour la stabilisation de la mutase liée à l'AdoCbl (Watkins and Rosenblatt, 2011). La protéine MMAB catalyse la dernière étape mitochondriale de la synthèse d'AdoCbl.

Défauts génétiques touchant seulement la MeCbl: défauts dans les gènes de MTR (CblG) et MTRR (CblE). Ces défauts induisent une homocystinurie.

Défauts génétiques affectant la synthèse de l'AdoCbl et de la MeCbl ensemble: défauts dans les gènes LMBRD1 (CblF), ABCD4 (CblF), MMACHC (CblC) et MMADHC (CblD). Ces défauts provoquent une homocystinurie et une acidurie méthylmalonique (Coelho *et al.*, 2008; Watkins and Rosenblatt, 1989, 2011).

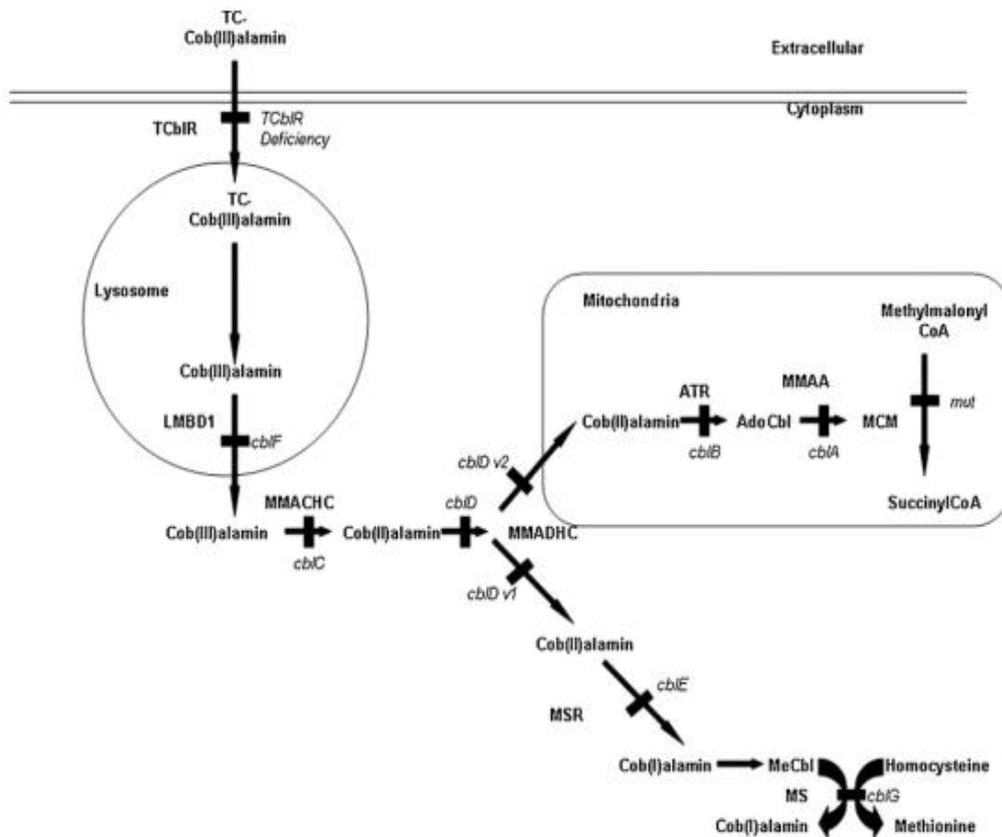


Figure 11: Métabolisme intracellulaire de la cobalamine (Watkins and Rosenblatt, 2011).

La cobalamine est absorbée par endocytose et convertie en AdoCbl utilisée par l'enzyme mitochondriale méthylmalonylCoA mutase (MCM), et en méthylcobalamine utilisée par l'enzyme cytoplasmique méthionine synthase (MS). Les sites affectés par les erreurs innées du métabolisme de la cobalamine cellulaire sont représentés. TcblR = transcobalamin receptor, impliqué dans la carence en TcblR; MCAA = le produit du gène MCAA, impliqué dans le trouble cblA; ATR = cobalaminadenosyltransférase impliqué dans le trouble CblB; MMACHC = le produit du gène MMACHC, impliqué dans le trouble cblC, MMADHC = produit du gène MMDHC, impliqué dans le trouble CblD, y compris le variant cblD 1 (cblD v1) et le variant cblD 2 (cblD v2); MSR = méthionine Synthase réductase impliquée dans le trouble cblE; MS = méthionine synthase, impliquée dans le trouble cblG, MCM = méthylmalonylCoA mutase, impliquée dans le trouble mut.

3.10. Carence en vitamine B12

3.10.1. Déficit d'apport

Une carence en vitamine B12 est souvent trouvée dans les pays qui sont sous-développés et où la consommation d'aliments d'origine animale n'est pas suffisante. Dans les pays développés, cette carence est souvent trouvée chez des sujets végétaliens.

3.10.2. Défauts d'absorption

Une carence en vitamine B12 peut être induite par une malabsorption de la vitamine B12 ou des maladies digestives. Comme par exemple l'anémie pernicieuse de Biermer caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre les cellules pariétales gastriques qui produisent normalement l'IF et d'anticorps contre le facteur intrinsèque, ce qui provoque une incapacité d'absorption de la cobalamine. D'autre part, les gastrectomies totales ou partielles, les maladies chroniques intestinales (maladie de Crohn), les maladies parasitaires (*Giardia Lamblia*) provoquent aussi une carence en vitamine B12 suite à des syndromes de malabsorption. (Akbulut *et al.*, 2010; Headstrom *et al.*, 2008; Murray, 1999; Stabler and Allen, 2004).

3.10.3. Conséquence de la carence en B12

Les conséquences cliniques de la carence en vitamine B12 sont des troubles neurologiques (polynévrites sensitives, ataxie, sclérose combinée de la moelle), hématologiques (macrocytose, anémie mégalo-blastique) et digestifs (glossite de Hunter), et il faut noter que la carence en vitamine B12 peut être associée à des carences en folates.

Cette carence induit une diminution de l'activité des 2 enzymes la méthionine synthase et la méthylmalonylcoenzyme A mutase qui sont Cbl-dépendantes (Allen *et al.*, 1990). Ceci induira une accumulation de l'acide méthylmalonique (MMA) et de l'Homocytéine dans le sang et dans les urines.

3.10.4. Perturbation de l'interaction entre la vitamine B12 et les folates

Le cycle des folates est perturbé par la carence en vitamine B12 pour deux raisons:

-La perte de l'inhibition allostérique de la MTHFR (MéthylèneTHF réductase) par la SAM : la carence en vitamine B12 induit une diminution de la méthionine et donc de la SAM. Sachant que la SAM est un inhibiteur allostérique de la MTHFR, la diminution de la SAM provoque une activation de la MTHFR. Le N⁵,10-Me THF sera converti en N⁵-Me THF. Il y aura alors

une accumulation du métabolite inactif N5-MeTHF, et une diminution du métabolite actif N5,10- MeTHF.

- Piège des folates ou folate trap : Dans le cycle des folates, le N5-MeTHF est métabolisé en THF après transfert du groupement méthyl vers la cobalamine pendant la synthèse de MeCbl qui est catalysé par la MTR ou méthionine synthase. La carence en vitamine B12 empêche donc cette réaction de régénération du THF, diminue la production du N5,10-MeTHF et limite la conversion du dUMP en dTMP. L'accumulation du dUMP favorise son incorporation excessive dans l'ADN ce qui est une raison d'instabilité génomique et provoque des cassures de brin.

4. Folates:

4.1. Structure chimique et nomenclature

En 1931, Lucy Willis a démontré que des extraits de foie et de levure, administrés par voie orale, étaient efficaces dans le traitement de l'anémie macrocytaire tropicale (Willis, 1931). De même, des singes soumis à un régime carencé en folates développent des anomalies sanguines corrigées par des extraits de levure, d'où le premier nom donné aux folates, la Vitamine M (Monkey) (Day *et al.*, 1935). Le facteur nutritionnel spécifique responsable de l'avantage thérapeutique observé a ensuite été isolé à partir d'extraits de foie et la structure chimique a été déterminée comme étant Acide N-(4-[[2-amino-4-oxo-1,4-dihydro-6-ptéridinyl)méthyl]amino}benzoyl)glutamique et le nom d'acide ptéroylglutamique a été proposé par les chercheurs chimistes (Angier *et al.*, 1946). Depuis cette époque, il y a eu une certaine ambiguïté dans la dénomination car le nom «acide folique» a été proposé simultanément pour un autre facteur ayant les mêmes propriétés nutritionnelles et qui était isolé des épinards, le mot «folique» dérivant du latin-folium (feuille) (Mitchell *et al.*, 1988). Ultérieurement, le nom d'acide folique est devenu couramment adopté, bien qu'il n'ait jamais été démontré clairement que les produits isolés du foie et des épinards étaient identiques. L'acide folique est composé de 3 entités : un résidu ptéridine, un acide p-aminobenzoïque -lié au carbone 6 du résidu ptéridine pour former l'acide pteroiq- et un résidu acide glutamique lié à l'acide aminobénoïque par une liaison amide.

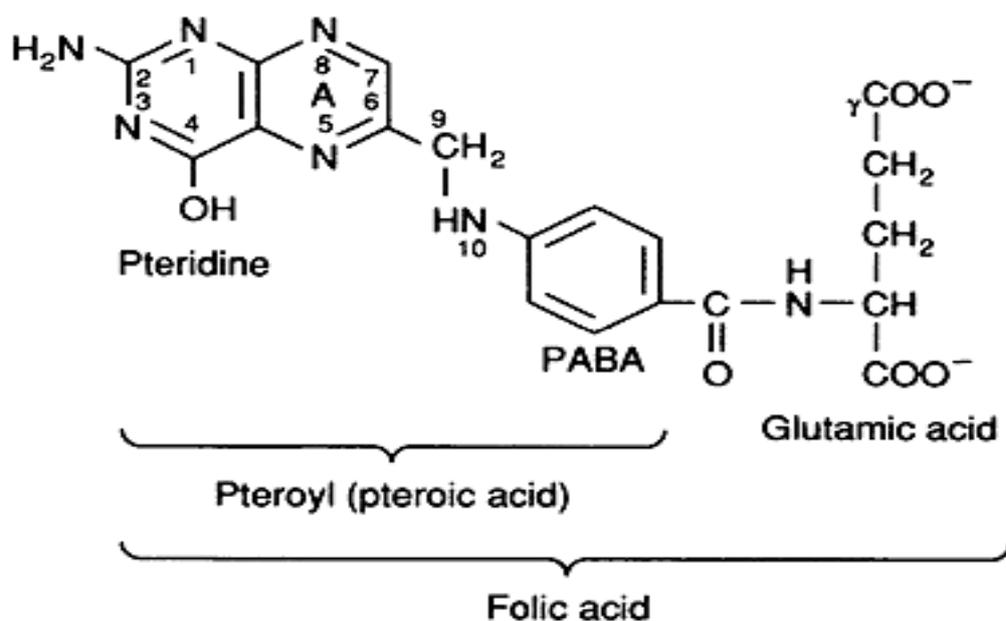
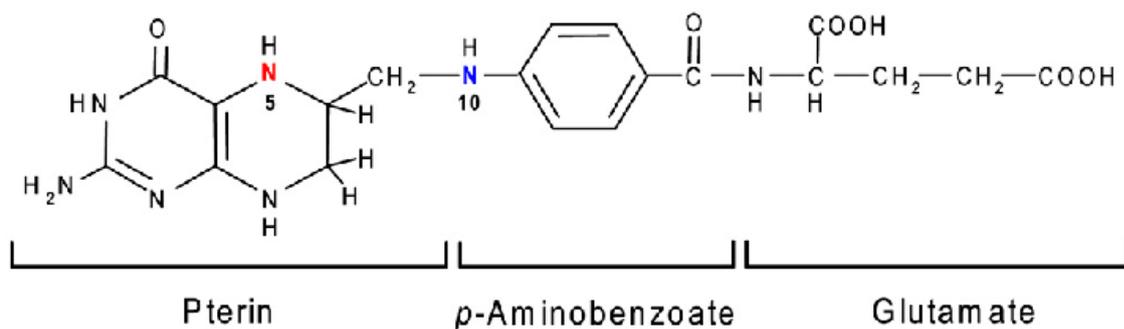


Figure 12: La structure et la nomenclature de l'acide folique synthétique monoglutamate



C ₁ unit	Name	Abbreviation
N ⁵ -CH ₃	5-methyl-THF	CH ₃ -THF
OHC- N ¹⁰	10-formyl-THF	10-CHO-THF
N ⁵ ====CH==== N ¹⁰	5,10-methenyl-THF	CH=THF
N ⁵ -CH ₂ - N ¹⁰	5,10-methylene-THF	CH ₂ -THF
N ⁵ -CHO	5-formyl-THF	5-CHO-THF

Figure 13: Structure des dérivés des folates.

Les folates naturels existent généralement sous forme de polyglutamates, dans lesquels chaque résidu de glutamate est lié par une liaison gamma glutamyl. Les autres folates naturels sont définis par leurs substituants aux positions N-5 et N-10.

L'acide folique est un analogue synthétique stable de la vitamine B9, qui se trouve dans les compléments alimentaires et qui est ajouté aux produits alimentaires transformés, comme les céréales et la farine. Par contre, le terme «folate» réfère aux formes naturelles de la vitamine et diffère principalement de l'acide folique par l'oxydation du cycle de la ptéridine, toute activité métabolique médiée par les folates étant attribuée aux dérivés du tétrahydrofolate (THF), qui est réduit aux positions 5, 6, 7 et 8. En plus de l'état d'oxydation, les folates biologiques varient par leur substituant monocarbonique sur les positions N10 et N5 ainsi que par le nombre de résidus d'acide glutamique qui forment une chaîne polyglutamate (Figures 12 et 13).

4.2. Nutrition

Les humains ne peuvent pas synthétiser les folates de novo et dépendent donc de sources alimentaires pour répondre à leurs besoins nutritionnels. Les sources alimentaires

naturellement riches en folates comprennent le foie, les légumes verts feuillus, le brocoli, les asperges, certains types de haricots et les agrumes. Les apports nutritionnels recommandés (ANR) telles que définies par la Food and Drug Administration (FDA) des Etats-Unis, selon l'avis de l'Institut de Médecine de l'Académie Nationale des Sciences est de 400 μ g / jour chez les hommes et les femmes de plus de 14 ans. Les ANR pour les femmes enceintes ou allaitantes est plus élevé tandis que les ANR pour les enfants et les nourrissons augmentent avec l'âge (Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference *et al.*, 1998). Les valeurs des apports nutritionnels conseillés (ANC) en France sont définies par tranche d'âge et en fonction de l'état physiologique dans le tableau 3.

Tableau 3: Apports nutritionnels conseillés (ANC) en folates pour la population française.

Catégorie	ANC 2001 ($\mu\text{g}/\text{J}$)
Nourrissons	70
Enfants de 1-3 ans	100
Enfants de 4-6 ans	150
Enfants de 7-9 ans	150
Enfants de 10-12 ans	250
Adolescents de 13-15 ans	300
Adolescents de 15-19 ans	300
Homme adultes	300
Femmes adultes	330
Personne âgée de plus e 75 ans	330-400
Femmes enceintes	400
Femmes qui allaitent	400

La “National Health and Nutrition Examination Survey” (enquête NHANES) (1988-1994) et la “Continuing Survey of Food Intakes by Individuals” (1994-1996) ont révélé que la plupart des personnes interrogées ne consommaient pas de niveaux adéquats de folate (Bialostosky *et al.*, 2002; Raiten and Fisher, 1995). Ces résultats ont déclenché le programme de fortification des acides foliques, qui a été initié par la FDA en 1998 pour augmenter le contenu en folates des aliments couramment consommés tels que les céréales et les graines grâce à l'addition d'acide folique pendant la transformation des aliments. Bien que les conséquences générales de cette supplémentation obligatoire aient été le sujet de nombreux débats, il est convenu de dire que l'état nutritionnel en termes de folates des personnes vivant aux États-Unis a été influencé positivement (Dietrich *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 1999). Cependant et malgré la fortification, on estime que la carence en folates affecte encore environ 10% de la population, ainsi que plus de 50% des enfants et des personnes âgées qui vivent dans la pauvreté aux États-Unis (Assantachai and Lekhakula, 2007; Bailey *et al.*, 1982).

4.3. Absorption et transport

Comme les humains dépendent des sources alimentaires pour le folate, les processus d'absorption et de transport sont essentiels pour déterminer l'état nutritionnel en folates. Les folates naturels dans les aliments sont des composés labiles et hydrosolubles, par conséquent, on estime que jusqu'à trois quarts de l'activité initiale des folates peuvent être perdus entre la récolte et la consommation (Scott *et al.*, 2000). Le 5-méthylTHF est facilement oxydé pendant le traitement et la préparation des aliments en 5-méthylDHF (5-methylDHF) (Donaldson and Keresztesy, 1962). Lors de l'ingestion, le 5-méthylDHF est rapidement dégradé dans les conditions acides du système digestif, tandis que le 5-méthylTHF est plus stable. L'acide ascorbique sécrété dans la lumière gastrique est un facteur critique pour la réduction du 5-méthylDHF de nouveau vers le 5-méthylTHF avant le transit vers les intestins (Lucock *et al.*, 1995).

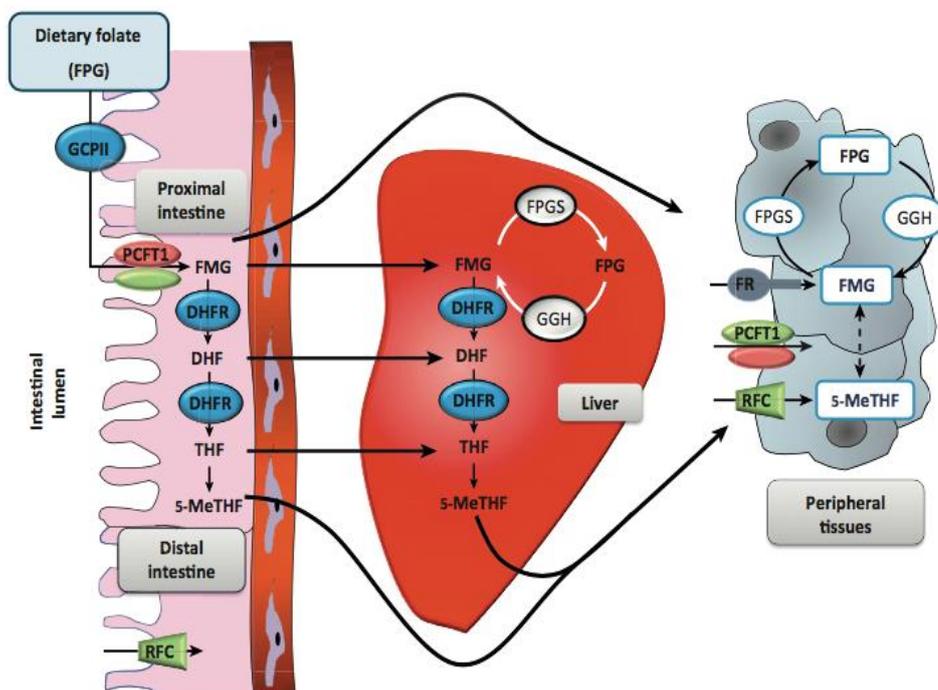
Dans l'intestin, il existe deux principales sources de folates. La première source est composée par les folates alimentaires, absorbés dans l'intestin grêle avec l'efficacité d'absorption la plus élevée dans le jéjunum proximal. La deuxième source est bactérienne : les folates sont synthétisés par la microflore normale du gros intestin et absorbés dans cette région de l'intestin (Kim *et al.*, 2004). La contribution des folates provenant de la microflore à maintenir un état nutritionnel adéquat reste incertaine; cependant, les facteurs qui altèrent la microflore, tels que l'alcoolisme, sont également associés à une malabsorption des folates et à la réduction de sa concentration circulante, ce qui indique l'importance potentielle de cette source. (Collins *et al.*, 1992).

Les polyglutamates des folates alimentaires doivent être transformés en monoglutamates avant l'absorption intestinale. Cette étape de conversion est régulée par l'enzyme γ -glutamyl hydrolase (GGH) (également appelée carboxypeptidase folylpoly- γ -glutamate). Cette enzyme existe sous deux formes, l'une membranaire, située sur les bordures en brosse des entérocytes et l'autre située dans les lysosomes intracellulaires (Chandler *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986). La forme intracellulaire est uniformément exprimée sur toute la longueur de l'intestin grêle, tandis que la forme membranaire est exprimée principalement dans la partie proximale de l'intestin grêle où l'absorption est maximale (Chandler *et al.*, 1991). La forme exprimée dans la bordure en brosse intestinale de la folate hydrolase est régulée positivement dans des conditions de carence en folates alimentaires (Said *et al.*, 2000).

Dans le petit et le gros intestin, l'absorption des monoglutamates est réalisée par des mécanismes de transport pH-dépendants et spécifiques. Les études sur les vésicules intestinales purifiées ont montré que le système d'absorption des folates était un processus concentrant saturable, fonctionnant le plus efficacement dans des conditions acides avec une affinité similaire pour les dérivés naturels (5-méthylTHF) et synthétiques oxydés (acide folique) (Said *et al.*, 1987; Selhub and Rosenberg, 1981). L'affinité similaire pour les dérivés des folates réduits et oxydés est unique à l'intestin et a conduit à découvrir que l'absorption des folates dans les intestins est associée à un échange d'anions hydroxylés et à des mécanismes de co-transport couplés aux protons. Ces mécanismes sont médiés par le transporteur d'acide folique réduit et le transporteur des folates couplé aux protons (hPCFT) (Balamurugan and Said, 2006; Nakai *et al.*, 2007). Il convient de noter qu'il existe d'autres récepteurs qui fixent les folates : les récepteurs FOLR1 ou FR α (Folate Receptor), attachés à la membrane plasmique par une ancre GPI (GlycosylPhosphatidylinositol) et qui présentent une affinité élevée pour l'acide folique ont été décrits dans de nombreux types de cellules (Henderson, 1990) et le RFC ou Reduced Folate Carrier. Les cellules épithéliales intestinales n'expriment pas ou n'utilisent les récepteurs FR α pour absorber les folates (Said *et al.*, 1997).

Au cours de l'absorption par les entérocytes, les folates monoglutamates sont transportés à travers la membrane basolatérale via le cotransporteur protons/folates, hPCFT (Said and Redha, 1987). Alors que le 5-méthylTHF est la forme des folates la plus abondante trouvée dans le plasma, des niveaux mesurables d'acide folique circulant ont été observés après la supplémentation orale à forte dose (Kalmbach *et al.*, 2008; Lucock *et al.*, 1989). Une fois dans le plasma, les folates monoglutamates sont ensuite distribués dans les tissus périphériques où ils sont absorbés par les cellules selon des mécanismes différents spécifiques de chaque type de tissu. Les récepteurs qui interviennent dans l'absorption dans les tissus périphériques peuvent être majoritairement classés en deux groupes. Le premier groupe est composé des canaux membranaires : de nombreuses protéines de ce type ont été caractérisées dans les tissus de mammifères et le système le mieux compris et le plus répandu est celui médié par le RFC. Cette protéine est un échangeur anionique bidirectionnel qui transporte les folates naturels réduits et les antifolates chimiothérapeutiques. Les propriétés cinétiques de transport du RFC montrent une affinité faible pour l'acide folique ($K_m=200-400 \mu M$) par rapport aux folates réduits ($K_m=1-10 \mu M$)

(Brzezinska *et al.*, 2000). Le transport par RFC n'est pas directement couplé au métabolisme énergétique. Le passage des folates à l'intérieur de la cellule est entraîné par le gradient d'anion organique transmembranaire. Le deuxième groupe de récepteurs des folates cellulaires est composé par les protéines spécifiques de liaison aux folates ancrées dans la membrane plasmique. À ce jour, trois isoformes ont été identifiées (FR α , FR β , FR γ) avec une expression différente selon les tissus. L'isoforme la plus abondante et la mieux caractérisée est le FR α avec une expression généralement localisée dans la membrane apicale des cellules épithéliales (Henderson, 1990; Weitman *et al.*, 1992). Ces récepteurs absorbent les folates par voie endocytotique en les internalisant puis les relâchant dans le cytoplasme cellulaire contre le gradient de concentration (Bosson, 2003). Contrairement au RFC, FR α présente une plus grande affinité pour l'acide folique et le 5-méthylTHF que pour les autres folates réduits (Brzezinska *et al.*, 2000). Enfin, le transporteur des folates couplé aux protons (hPCFT) peut aussi être actif dans les tissus périphériques. (Figure 14)



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Figure 14: L'absorption et la distribution du folate dans le foie et les tissus périphériques.

Les polyglutamates de folate (FPG) sont hydrolysés en monoglutamates de folate (FMG) par la glutamate carboxypeptidase II (GCPII). Les monoglutamates sont absorbés par le transporteur de folate couplé au proton (PCFT1). Trois systèmes de protéines de transport de folate sont impliqués dans l'absorption de folate dans le foie et les tissus périphériques: le

transporteur de folate réduit (RFC), les récepteurs de folate (FR) et le PCFT1. La polyglutamylation de folate est catalysée par la folylpoly- γ -glutamate synthetase (FPGS). À l'inverse, le FPG peut être hydrolyse en FMG par la γ -glutamyl hydrolase (GGH). (Gueant et al., 2013)

4.4. Métabolisme

Les folates absorbés par les cellules sont presque exclusivement sous forme monoglutamates. Ils sont stockés dans les tissus après polyglutamylation, une réaction consommant de l'énergie dans laquelle jusqu'à 9 unités glutamate sont ajoutées au groupe γ -carboxyle du résidu glutamate entrant dans la composition des dérivés des folates. Cette réaction est catalysée par l'enzyme folyl-poly- γ -glutamate synthétase 24 (FPGS) (Shane, 1989). L'activité FPGS a été caractérisée dans de nombreuses cellules et montre une affinité pour le THF comme substrat primaire des folates pour la polyglutamylation. Comme les folates primaires obtenus à partir de l'alimentation sont le 5-méthylTHF et l'acide folique synthétique, les enzymes cellulaires capables de convertir ces 2 dérivés des folates en THF, la méthionine synthase (MS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), sont considérées comme limitantes pour la formation de réserves cellulaires en folates (Lucock, 2000). Les polyglutamates, en plus d'être de meilleurs substrats que les monoglutamates pour les enzymes folates-dépendantes, peuvent s'accumuler dans la cellule car ils ne constituent plus des substrats pour le RFC bidirectionnel et ne peuvent pas être expulsés hors des cellules via les pompes ATP-dépendantes telles que les protéines de multirésistance aux médicaments (Matherly and Goldman, 2003; Shane, 1989; Zeng *et al.*, 2001). L'activité de la FPGS est contrariée par l'activité lysosomale de la GGH qui catalyse l'hydrolyse des résidus γ -glutamyl terminaux à partir des folates polyglutamylés (Ifergan *et al.*, 2008).

Les polyglutamates sont des cofacteurs pour le transfert des monocarbones dans de nombreuses réactions enzymatiques. Dans les cellules, cinq réactions majeures de transfert de groupements monocarbonés faisant intervenir les folates ont été caractérisées: la conversion de la sérine en glycine, le catabolisme de l'histidine, la synthèse de thymidylate, de méthionine et des purines. En plus des groupes méthyle ou formyle fournis par l'apport alimentaire de 5-méthylTHF et de 5-formylTHF, les unités monocarbones utilisées dans le métabolisme des groupementt monocarbonés sont principalement dérivées du β -carbone de la sérine convertie en glycine par l'enzyme serine hydroxyméthyltransférase (SHMT) :

cette réaction transfère le groupe β -carbone de la sérine au THF pour former le 5,10-méthylène tétrahydrofolate (5,10-méthylène THF). Le groupe formimino généré par la dégradation de l'histidine, le groupe carboné généré par la glycine décarboxylase dans la dégradation mitochondriale de la glycine, les groupes méthyles générés par le catabolisme de la choline lors de la formation de glycine et sarcosine et le formiate ont tous été identifiés comme sources supplémentaires d'unités monocarbonées (Lucock, 2000). Une vue d'ensemble du métabolisme des folates intracellulaires est représentée dans la Figure 15.

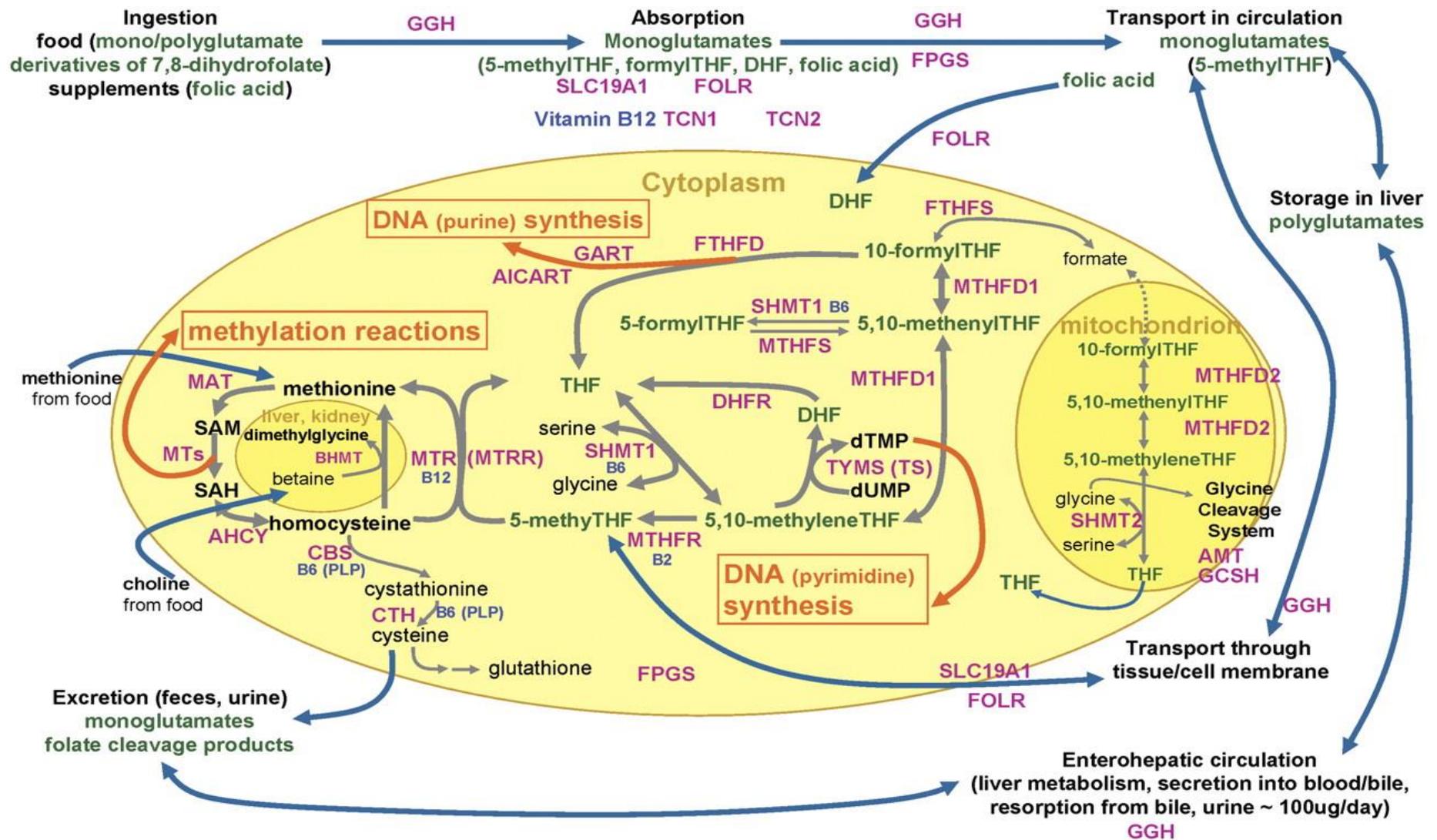


Figure 15: Le métabolisme des folates et des monocarbone (Lim *et al.*, 2007)

AHCY, S-adenosylhomocysteine hydrolase; *AICART*, phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase; *AMT*, aminomethyltransferase; *B6*, vitamin B6; *B2*, vitamin B2; *B12*, vitamin B12; *BHMT*, betaine-homocysteine methyltransferase; *CBS*, cystathionine-beta-synthase; *CTH*, cystathionase; *DHF*, dihydrofolate; *DHFR*, dihydrofolate reductase; *FPGS*, folylpolyglutamate synthase; *dTMP*, deoxythymidine monophosphate; *dUMP*, deoxyuridine monophosphate; *FOLR*, folate receptor; *FTHFD*, 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase; *FTHFS*, 10-formyltetrahydrofolate synthase; *FTHFSDC1*, 10-formyltetrahydrofolate synthetase domain containing 1; *GART*, glycinamide ribonucleotide formyltransferase; *GCPII*, glutamate carboxypeptidase II; *GCSH*, glycine cleavage system protein H; *GGH*, gamma-glutamylhydrolase; *MAT*, methionine S-adenosyltransferase; *MTs*, a group of methyltransferases; *MTHFD1*, cytoplasmic 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; *MTHFD2*, mitochondrial 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; *MTHFR*, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; *MTHFS*, 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase; *MTR*, methionine synthase; *MTRR*, methionine synthase reductase; *PLP*, pyridoxal 5'-phosphate; *SAH*, S-adenosylhomocysteine; *SAM*, S-adenosylmethionine; *SHMT1*, cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase; *SHMT2*, mitochondrial serine hydroxymethyltransferase; *SLC19A1*, reduced folate carrier; *TCN1*, transcobalamin 1; *TCN2*, transcobalamin 2; *THF*, tetrahydrofolate; and *TYMS*, thymidylate synthetase.

Les folates sont utilisés pour la biosynthèse des bases pyrimidines et purines entrant dans la composition des nucléotides. Le 10-formylTHF intervient 2 fois dans la synthèse des purines. D'abord, une unité monocarbonée est transférée du 10-formylTHF au ribonucléotide glycinamide (GAR) par l'enzyme GAR transformylase pour former le ribonucléotide N-formylglycinamide (FGAR). Ensuite, une deuxième unité monocarbonée est transférée du 10-formylTHF sur le ribonucléotide aminoimidazol-4-carboxamide (AICAR) par l'enzyme AICAR transformylase pour former le N-formylaminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide (FAICAR). Les groupes de formiate transférés deviennent les carbones 8 et 2 du cycle des purines. Pour la synthèse des pyrimidines, le groupe méthyle du 5,10-méthylène THF est transféré sur le monophosphate de désoxyuridylate (DUMP) pour former le monophosphate de désoxythymidylate (dTMP). Cette réaction de méthylation réductrice est catalysée par la thymidylate synthase (TS) et produit le dihydrofolate (DHF). Le DHF est ensuite réduit en THF par l'enzyme DHFR et au cours de cette réaction le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) est oxydé en NADP⁺ (Kompis *et al.*, 2005). Le méthyleTHF est utilisé pour remétyler l'homocystéine (Hcy) en méthionine, qui est ensuite convertie en S-adénosylméthionine (SAM), le donneur de méthyle universel pour toutes les réactions de méthylation intracellulaire, y compris celles de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des lipides. Au cours de la reméthylation de l'Hcy, le 5,10-méthylèneTHF est d'abord réduit en 5-méthylTHF dans une réaction fonctionnellement irréversible catalysée par l'enzyme méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) (Green *et al.*, 1988). Le groupe méthyle du 5-méthylTHF est ensuite transféré sur l'Hcy au cours d'une réaction catalysée par la MS et dépendante de la vitamine B12 par l'enzyme MS (Stokstad and Koch, 1967).

Les folates sont impliqués dans plusieurs rôles biologiques qui nécessitent des cycles d'interconversion complexes, facilités par de nombreuses enzymes. Dans les cellules proliférantes, la synthèse de l'ADN est primordiale et l'expression de l'enzyme TS augmente pendant la phase S du cycle cellulaire pour assurer un apport adéquat de thymidylate. La synthèse accrue de thymidylate génère des concentrations élevées de DHF qui est un inhibiteur allostérique de MTHFR. L'inhibition de MTHFR rend le 5,10-méthylène THF disponible pour la synthèse des purines et pyrimidines plutôt que pour la formation de méthionine (Matthews and Baugh, 1980). La synthèse de méthionine est régulée par les niveaux du 5-méthylTHF et du SAM. Des niveaux élevés de SAM, indiquant une capacité de méthylation abondante, inhibent la MTHFR et donc la formation de 5-méthylTHF. À l'inverse,

si les niveaux de 5-méthylTHF sont élevés, reflétant des niveaux faibles de SAM et une capacité de méthylation réduite, plusieurs méthyltransférases sont inhibées afin de réserver les concentrations limitées de SAM aux réactions de méthylation essentielles (Lucock, 2000; Wagner *et al.*, 1985). Compte tenu de la complexité du métabolisme, de la régulation et de l'interconversion des folates en association avec les rôles essentiels que les folates jouent dans les réactions biosynthétiques, il n'est pas surprenant que le taux de folates soit un déterminant de la santé humaine.

4.5. Santé humaine

Les folates ont d'abord été découverts comme un facteur efficace dans le traitement de l'anémie macrocytaire (Willis, 1931). La carence en folates entraîne une anémie mégalo-blastique. L'intérêt pour les folates a grandi quand il a été démontré que les folates jouent un rôle dans la prévention des défauts du tube neural tels que le spina bifida et l'anencéphalie (Milunsky *et al.*, 1989). Les liens entre folates et anomalies congénitales ont suggéré qu'un apport adéquat en folates est critique avant et pendant les premiers stades de la grossesse, ce qui a provoqué une ré-évaluation des habitudes nutritionnelles et la mise en place du programme obligatoire de fortification en acide folique initié par la FDA en 1998 (Bialostosky *et al.*, 2002; Raiten and Fisher, 1995). Une diminution significative des défauts de fermeture du tube neural a été observée dans les Etats-Unis et dans d'autres pays après le démarrage des programmes de fortification en acide folique (De Wals *et al.*, 2007; Honein *et al.*, 2001). La supplémentation en folates semble produire des conséquences bénéfiques sur d'autres pathologies puisqu'il a été suggéré qu'un apport adéquat est protecteur contre d'autres anomalies congénitales comme les malformations cardiovasculaires, les anomalies des voies urinaires, les fentes labio-palatines et le syndrome de Down (Goh and Koren, 2008). Bien que les mécanismes précis responsables du défaut de fermeture du tube neural et d'autres défauts congénitaux restent incertains et constituent un sujet d'investigation continue, il est clair que les folates jouent un rôle important dans la reproduction humaine.

Un dysfonctionnement du métabolisme des folates pourrait être en cause dans de nombreuses conditions pathologiques. Une hyperhomocystéinémie est souvent retrouvée dans les maladies artérielles occlusives (Mudd *et al.*, 1964). Les études humaines et animales montrent qu'il existe un lien entre les niveaux d'Hcy et les maladies vasculaires et qu'il existe une relation réciproque entre les concentrations plasmatiques d'Hcy et de folates. Il est

maintenant confirmé que même des élévations modestes de la concentration d'Hcy plasmatique ont un effet pathologique sur l'endothélium vasculaire et l'Hcy est considérée comme un facteur de risque pour l'artériosclérose et la thrombose veineuse (Welch and Loscalzo, 1998). La supplémentation en folates est proposée comme une mesure préventive contre les maladies artérielles occlusives parce que les niveaux élevés de 5-méthylTHF peuvent abaisser les concentrations plasmatiques d'Hcy en facilitant la reméthylation de l'Hcy en méthionine (Lonn *et al.*, 2006). De plus, les individus avec des niveaux élevés d'Hcy plasmatique présentent des déficits cognitifs et il existe un lien véritable entre la maladie artérielle occlusive et la maladie d'Alzheimer (Clarke *et al.*, 1998). La supplémentation en 5-méthylTHF pourrait prévenir les troubles de l'humeur et améliorer la cognition puisque les méthyltransférases interviennent dans le métabolisme des neurotransmetteurs et le 5-méthylTHF est passé rapidement du plasma vers le plexus choroïdien où il est concentré dans le liquide céphalo-rachidien (Godfrey *et al.*, 1990; Lucock, 2000).

En plus de réduire les taux plasmatiques d'Hcy, la supplémentation en folates peut également améliorer la génération de SAM et ainsi faciliter les réactions dépendantes de la méthylation. La méthylation est étroitement liée à la santé humaine. Les altérations dans les profils de méthylation de l'ADN peuvent induire des modifications épigénétiques et des changements dans les expressions des gènes impliqués dans la suppression des tumeurs, dans la carcinogenèse, ainsi que dans l'élimination des toxines environnementales. Un exemple qui illustre le rôle des folates dans la détoxification est celui de l'arsenic inorganique qui est méthylyé dans différents tissus à travers une série de réactions qui facilitent son excrétion du corps (Kile and Ronnenberg, 2008). Des études portant sur l'interaction entre métabolisme de l'acide folique et métabolisme de l'arsenic indiquent que l'augmentation des concentrations plasmatiques des folates est associée à une diminution des taux d'arsenic dans le sang et une augmentation significative de la quantité de métabolites d'arsenic méthylyés excrétés dans les urines (Gamble *et al.*, 2006; Gamble *et al.*, 2007). L'exposition chronique à l'arsenic environnemental augmente le risque de cancer de la vessie, du foie, des poumons et de la peau (Bates *et al.*, 1992).

Beaucoup de travaux ont aussi porté sur le rôle des folates dans le cancer. Un nombre croissant de cancers spécifiques ont été liés aux carences en folates, incluant les cancers du côlon, du sein, du pancréas, de l'estomac, du col de l'utérus, du sang et de la peau (Butterworth, 1993; Fang *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2007; Kamei *et al.*, 1993; Skibola *et al.*,

1999; Slattery *et al.*, 1999; Stolzenberg-Solomon *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). Les associations entre l'apport alimentaire en folates et les cancers sont soutenues par des études sur les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des folates : certains polymorphismes pourraient modifier le risque de cancer. Il est intéressant de noter que le polymorphisme C667T de la MTHFR, entraînant le substitution en acides aminés A222V, est associé avec une protection contre le cancer du côlon et la leucémie aiguë lymphoblastique en raison de l'augmentation des taux de 5,10-méthylène THF disponibles pour la synthèse des pyrimidine et de l'ADN résultant d'une activité réduite de MTHFR (Houlston and Tomlinson, 2001; Lucock, 2000).

4.6. Folates dans le traitement et prévention contre le cancer

En 1945, il a été observé par Lewisohn *et al.* que l'acide folique concentré provoque une régression des tumeurs mammaires chez la souris (Leuchtenberger *et al.*, 1945). Sur la base de ces résultats, Farber *et al.* ajoutent des polyglutamates d'acide folique au traitement thérapeutique des enfants atteints de leucémie. De façon inattendue, l'administration d'acide folique a accéléré considérablement la progression de la maladie (Farber *et al.*, 1947). Suite à ces observations, Farber *et al.* ont démontré qu'un antagoniste de l'acide folique, l'aminoptérine, induit une rémission chez des enfants atteints de leucémie aiguë (Farber and Diamond, 1948). À partir de ces résultats, l'ère moderne de la chimiothérapie antifolate est née et, avec elle, le dogme que la déplétion en folates était la cause des effets antitumoraux observés dans la thérapie antifolate.

Ce n'est qu'en 1980 que des observations épidémiologiques et cliniques ont commencé à apparaître suggérant une association inverse entre le taux de folates et le risque de tumeurs malignes. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle des folates dans la cancérogenèse. La déplétion en folates favoriserait l'instabilité génomique en altérant l'incorporation de nucléotides dans l'ADN et en altérant les mécanismes de réplication et réparation de l'ADN (Kompis *et al.*, 2005; Lucock, 2000). Elle ralentirait la reméthylation de l'Hcy en méthionine entraînant la diminution de biosynthèse de la SAM, ce qui perturbe la régulation épigénétique de l'expression des gènes (Ulrey *et al.*, 2005).

Malgré des travaux de plus en plus nombreux sur le rôle biochimique des folates dans la biologie humaine, la relation exacte entre taux de folate et cancérogenèse n'est pas clairement établie. Cette relation a été le mieux étudiée dans le cancer colorectal. De

nombreuses études comparant les patients qui utilisent ou n'utilisent pas de suppléments multivitaminiques ou des individus recevant de fortes ou de faibles doses d'acide folique ont suggéré que l'augmentation de l'apport en folates entraîne une réduction du risque de développer un cancer colorectal primaire ou des adénomes précurseurs (Jaszewski *et al.*, 2008; Kim, 2007; Sanjoaquin *et al.*, 2005). Cependant, ce résultat n'a pas été confirmé par d'autres études qui ont conclu qu'aucun effet protecteur n'est obtenu après supplémentation en acide folique (Kim, 2007; Logan *et al.*, 2008). De plus, une étude a rapporté qu'une supplémentation en acide folique de 1 mg/jour chez les patients ayant des antécédents d'adénomes colorectaux entraîne un risque accru de 67% de lésions cancéreuses au stade avancé, un risque 2 fois plus élevé d'adénomes multiples, et un risque significativement augmenté d'autres types de cancer (Lee *et al.*, 2011).

L'effet favorisant les tumeurs notées lors de la supplémentation en acide folique a aussi été observée dans de nombreuses études sur les animaux. Ces études ont indiqué que la supplémentation en folates produit un effet ambiguë sur la progression du cancer en fonction du moment de l'intervention et de la dose. Le point de vue actuel est que la carence en folates inhibe, alors que la supplémentation en folates, favorise la progression des néoplasmes colorectaux déjà établis. En revanche, la carence en folates dans la muqueuse colorectale normale semble la prédisposer à une transformation néoplasique, et la supplémentation en acide folique peut supprimer cet effet à des doses modérées (Kim, 2007, 2008). Dans l'ensemble, les résultats indiquent un lien puissant entre les folates et le cancer; cependant, les stratégies utilisant les folates dans le but de traiter ou de prévenir les maladies malignes humaines sont comparées à une «épée à double tranchant» et nécessitent de prendre des précautions pour comprendre le contexte biologique spécifique de l'intervention afin de maximiser les effets bénéfiques tout en minimisant les risques associés.

5. Les modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont des changements dans l'expression des gènes, héréditaires, réversibles mais sans modification de la séquence d'ADN. Parmi les mécanismes de modifications épigénétiques on cite: la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des queues des histones, l'interférence à l'ARN, le remodelage de la chromatine et le système polycomb-trithorax (Waterland and Michels, 2007) (Figure 16).

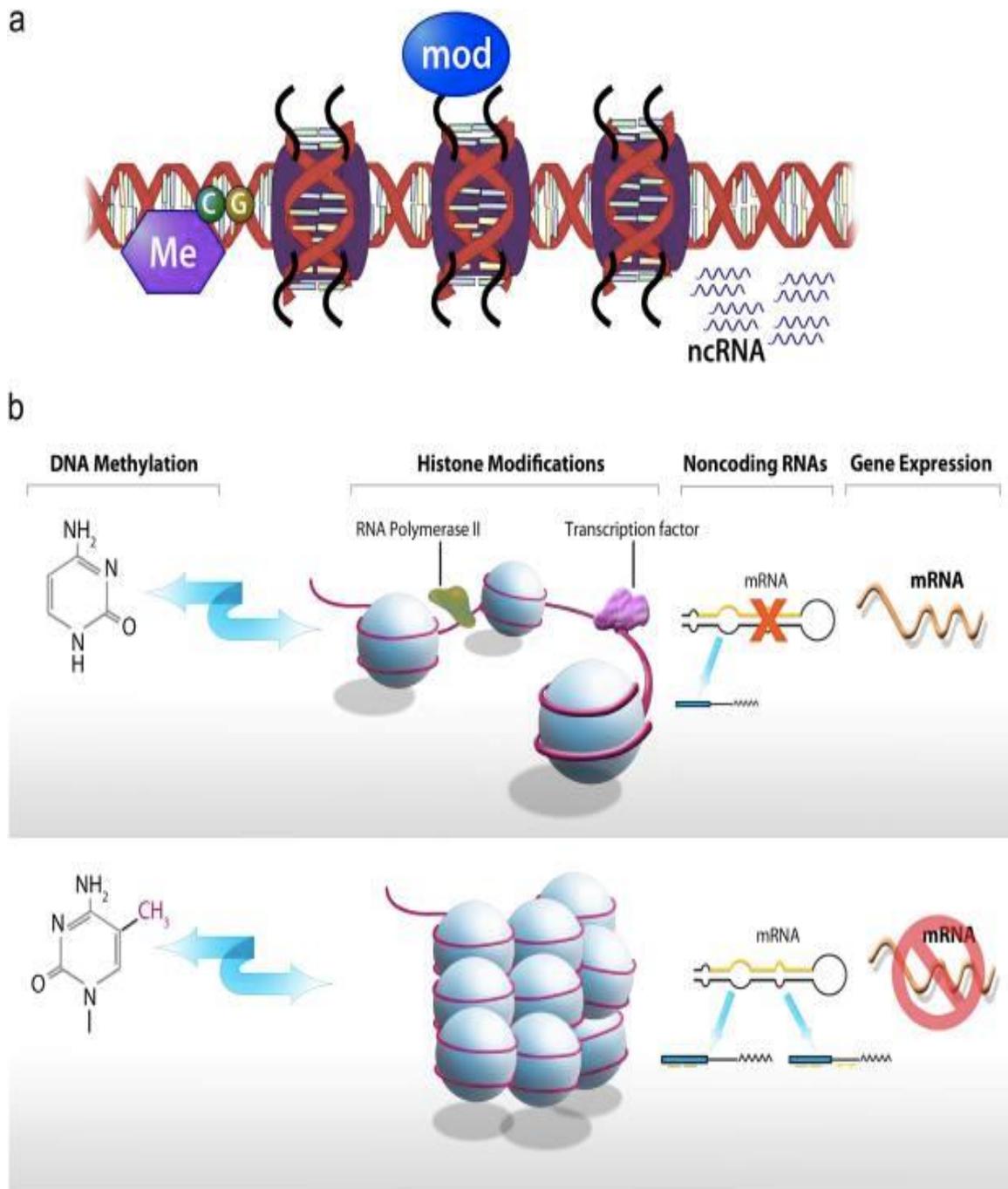


Figure 16: Mécanismes épigénétiques chez les eucaryotes

(a) la méthylation de l'ADN, les modifications des queues d'histones et les ARN non codants.
 (b) Effet des marques épigénétiques sur l'expression des gènes. Des flèches bleues larges indiquent des cross-talk entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. (Yang and Schwartz, 2011)

L'ADN génomique des cellules eucaryotes est compacté avec les histones sous forme de chromatine. Des modifications au niveau de l'ADN ou des histones sont nécessaires pour ouvrir la chromatine et la rendre accessible. Ainsi il existe deux types de chromatine: l'euchromatine qui correspond à l'état relâché, accessible aux facteurs de transcription, et l'hétérochromatine qui correspond à un haut degré de compaction et à une forte répression de la transcription (Sawan and Herceg, 2010).

5.1. La méthylation de l'ADN

5.1.1. Définition

La méthylation de l'ADN est une modification post-réplivative qui s'effectue sur les cytosines des dinucléotides cytosine-guanine présents souvent dans les îlots CpG. La SAM donne les groupements méthyles qui seront transférés par des ADN méthyltransférases (DNMTs) sur le C5 des cytosines. Un taux faible de méthylation favorise l'expression des gènes alors qu'un taux plus élevé inhibe leur expression (Holliday and Grigg, 1993) (Figure 17).

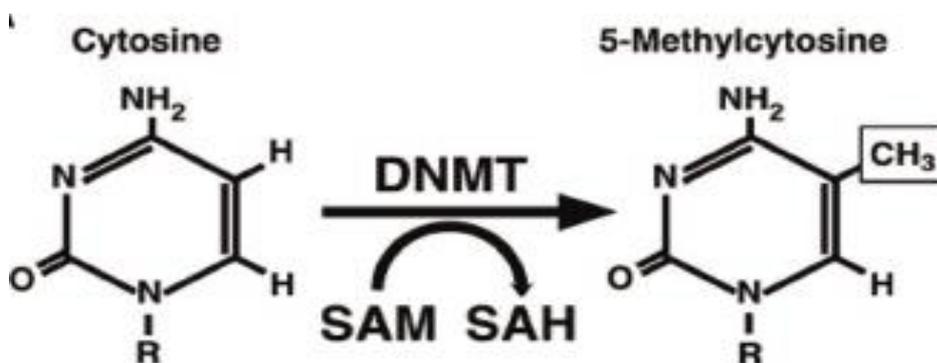


Figure 17: Mécanisme de la méthylation de l'ADN.

La méthylation des cytosines est effectuée par les enzymes DNMT et se produit sur des paires de dinucléotides CpG. Les DNMT transfèrent un groupe méthyle de la S-adenosylméthionine (SAM) sur la position 5-carbone de la cytosine (CH₃ encadré), formant la 5-méthylcytosine et la S-adenosylhomocystéine (SAH). (Weidman et al., 2007)

5.1.2. La méthylation de l'ADN et le cancer

Les cellules tumorales sont caractérisées par une hypométhylation globale. La méthylation des îlots CpG régule l'expression des gènes par l'intermédiaire de protéines régulatrices ou de complexes répresseurs (Waterland and Michels, 2007). Des mutations ponctuelles sur les dinucléotides CG peuvent toucher des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs : Les cytosines peuvent subir des déaminations en uraciles et les 5-méthylcytosines des déaminations en thymine. Il y a une interaction entre les enzymes qui méthylent l'ADN et les enzymes qui modifient les histones. Les modifications des histones interviennent dans la régulation des gènes avec ou sans variations de la méthylation des îlots CpG (Ballestar *et al.*, 2003; Fraga and Esteller, 2005).

5.2. Les modifications des histones

5.2.1. Définition

Les histones sont les protéines les plus abondantes de la chromatine. Il en existe 5 types qui se répartissent en deux familles : les histones nucléosomiques (H1A, H2B, H3 et H4) responsables de l'enroulement de l'ADN dans les nucléosomes et les histone H1 ou histones internucléosomiques (Figure 18). La chromatine est formée d'une répétition de sous-unités appelées nucléosomes. Le nucléosome est formé d'environ 150 paires de bases d'ADN qui sont enroulées autour d'un octamère d'histones. Cet octamère comprend deux dimères d'histones H2A-H2B et deux dimères d'histones H3-H4.

Chaque histone comporte un domaine globulaire central et un domaine N-terminal d'acides aminés appelé « queue ». Ces queues sont les sites des modifications post-traductionnelles pouvant relâcher ou compacter la chromatine. Parmi ces modifications il y a : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la déamination, l'ADP ribosylation, l'isomérisation de proline et la propionylation (Kouzarides, 2007).

Les modifications des histones sont lues par un ensemble de protéines qui traduisent les combinaisons des modifications en un état actif ou répressif, c'est le code des histones. Ainsi une modification selon la combinaison dans laquelle elle se trouve peut donner des effets différents en aval. Cependant des marques chromatiniennes affectant des résidus uniques ont été identifiées comme étant activatrices ou inhibitrices.

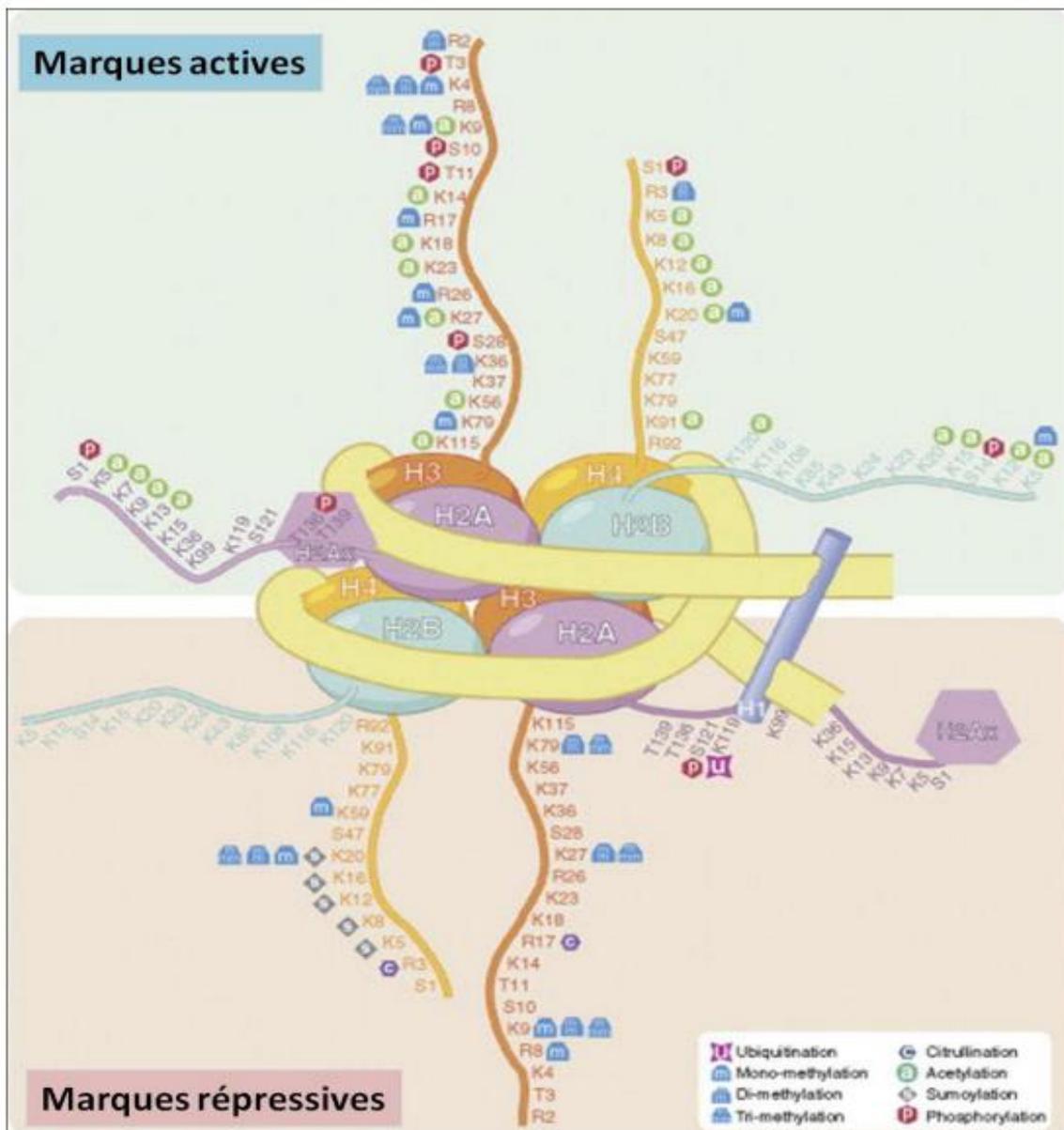


Figure 18: Représentation schématique du nucléosome.

L'ADN est enroulé autour d'un octamère de quatre histones H2A ; H2B ; H3 et H4. L'histone H1 effectue la liaison en se liant à l'ADN entre les nucléosomes. Différents acides aminés constituant les queues d'histones sont représentés avec les différentes modifications covalentes spécifiques de chaque résidu. Les marques actives sont présentées dans la partie supérieure de la figure et les marques répressives sont représentées dans la partie inférieure de la figure. Lysine (K), arginine (R), serine (S) et thréonine (T)(Sawan and Herceg, 2010).

5.2.2. L'acétylation des histones

Les histones sont acétylées sur les résidus lysine. Cette réaction est contrôlée par deux familles d'enzymes : les histone acétyltransférases (HATs) et les histones déacétylases

(HDACs) (Rundlett *et al.*, 1996). Ces deux enzymes fonctionnent comme des complexes multiprotéiques pour une réaction réversible (Suganuma and Workman, 2008). Les résidus basiques des histones sont chargés positivement. L'acétylation des résidus lysine permet la neutralisation de cette charge et affaiblit ainsi l'interaction entre histones et ADN qui est chargé négativement. Ceci induit donc un changement de conformation de la chromatine en la rendant plus accessible aux facteurs de transcription. Une hyperacétylation des histones est donc considérée comme un signe d'activation de la transcription : les histones sont déacétylées dans l'euchromatine. La déacétylation des histones consolide les interactions entre histones et ADN, d'où la diminution de l'accessibilité des facteurs de transcription et la conformation fermée de la chromatine ou hétérochromatine (Sawan and Herceg, 2010). La perte de la marque H4K16Ac est une marque universelle de la tumorigenèse (Fraga and Esteller, 2005). Cette acétylation déstabilise le nucléosome et entraîne un remodelage de la chromatine (Shogren-Knaak *et al.*, 2006).

5.2.3. La méthylation des histones

Les queues des histones subissent des modifications de méthylation surtout l'histone 3 et l'histone 4 sur les résidus lysine ou arginine (Lee *et al.*, 2005). Cette méthylation est effectuée par les enzymes histone lysine méthyle transférase (HKMTs) méthylants les lysines et les protéines arginine méthyle transférase (PRMTs) méthylants les arginines en utilisant la SAM comme donneur de groupements méthyles. Plusieurs études ont montré que la méthylation des arginines pourrait jouer un rôle important dans l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. La méthylation des lysines peut être soit une marque de l'euchromatine soit une marque de l'hétérochromatine selon le résidu méthylé. La méthylation des histones H3K9, H4K20 et H3K27 est associée à l'hétérochromatine alors que la méthylation des histones H3K4, H3K36 et H3K79 est associée à l'euchromatine.

Une activité anormale de ces enzymes est trouvée dans plusieurs cancers (Biancotto *et al.*, 2010).

5.2.4. Les modifications des histones et cancer

Les modifications des histones contrôlent différents mécanismes cellulaires critiques comme la réparation de l'ADN, la transcription, la réplication de l'ADN et le cycle cellulaire. Par conséquent, les modifications des histones sont des processus étroitement contrôlés qui nécessitent une bonne coordination en réponse à des stimuli intrinsèques ou externes. La

dérégulation de l'une de ces modifications peut déplacer l'équilibre de l'expression des gènes conduisant à des altérations dans les mécanismes cellulaires tels que la transcription, la prolifération, l'apoptose et la réparation de l'ADN, entraînant finalement une transformation cellulaire et une croissance maligne. De nombreuses études ont révélé des modifications épigénétiques aberrantes entraînant une mise sous silence de gènes suppresseurs de tumeurs et d'autres gènes associés au cancer dans une variété de cancers humains (Feinberg and Tycko, 2004). En outre, la dérégulation des modifications des histones peut déclencher des changements génétiques grâce à des fonctions aberrantes de processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN, la transcription des gènes et la réplication de l'ADN (Sawan *et al.*, 2008).

Des études récentes suggèrent également que la perturbation épigénétique dans les cellules souches peut être à l'origine du cancer. L'idée est que ces aberrations épigénétiques se produisent dans les cellules souches normales et qu'elles sont parmi les premiers événements impliqués dans le développement du cancer (Feinberg *et al.*, 2006). Ceci est soutenu par la découverte de cellules souches altérées dans les tissus normaux des patients cancéreux et est cohérent avec le fait que les tumeurs ont une population hétérogène de cellules ayant des propriétés tumorigènes diverses (Al-Hajj *et al.*, 2003). Étant donné que les mécanismes épigénétiques sont essentiels pour maintenir l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation dans les cellules souches (Niwa, 2007), il est évident que toute altération de l'état épigénétique des cellules souches normales peut entraîner l'expansion des populations aberrantes et aide à l'accumulation d'autres aberrations épigénétiques et génétiques conduisant à une carcinogenèse. Au total, de nombreuses enzymes modifiant les histones ont une activité dérégulée dans une variété de cancers humains.

6. La méthionine dépendance

6.1. Définition

La méthionine dépendance est une caractéristique observée dans certaines cellules cancéreuses et d'autres cellules transformées, mais pas dans des cellules non transformées. Elle fait référence à l'incapacité des cellules à proliférer lorsque la méthionine est remplacée dans le milieu par son précurseur, l'homocystéine, en présence de cobalamine et de folate (milieu met-hcy+). La méthionine dépendance affecte la prolifération cellulaire à travers plusieurs (3-15) jours; La prolifération peut être évaluée en comptant des cellules (Mecham *et al.*, 1983; Watkins, 1998), en incorporant du [³H] thymidine pour examiner la réplication de l'ADN (Judde and Frost, 1988), ou en déterminant le taux total de protéines (Tang *et al.*, 2000a).

Plusieurs études ont conclu que certains cancers sont méthionine dépendants. Il a été démontré que la carence en méthionine ralentit la croissance des cellules MCF7 et induit une réponse transcriptionnelle prononcée et spécifique (Tang *et al.*, 2015). La méthionine semble jouer un rôle qui incite à la considérer à part parmi les amino acides. En effet, la carence individuelle portant sur n'importe quel acide aminé autre que la méthionine n'entraîne pas une inhibition de la croissance cellulaire aussi marquée que la carence en méthionine. Certes, cette carence en un acide aminé unique autre que la méthionine induit une réponse transcriptionnelle mais qui diffère radicalement de celle induite par la carence en méthionine : elle manque de spécificité, dans le sens où elle semble similaire pour tous les acides aminés, et elle n'est pas aussi prononcée que la réponse transcriptionnelle induite par la carence en méthionine (Figure 19).

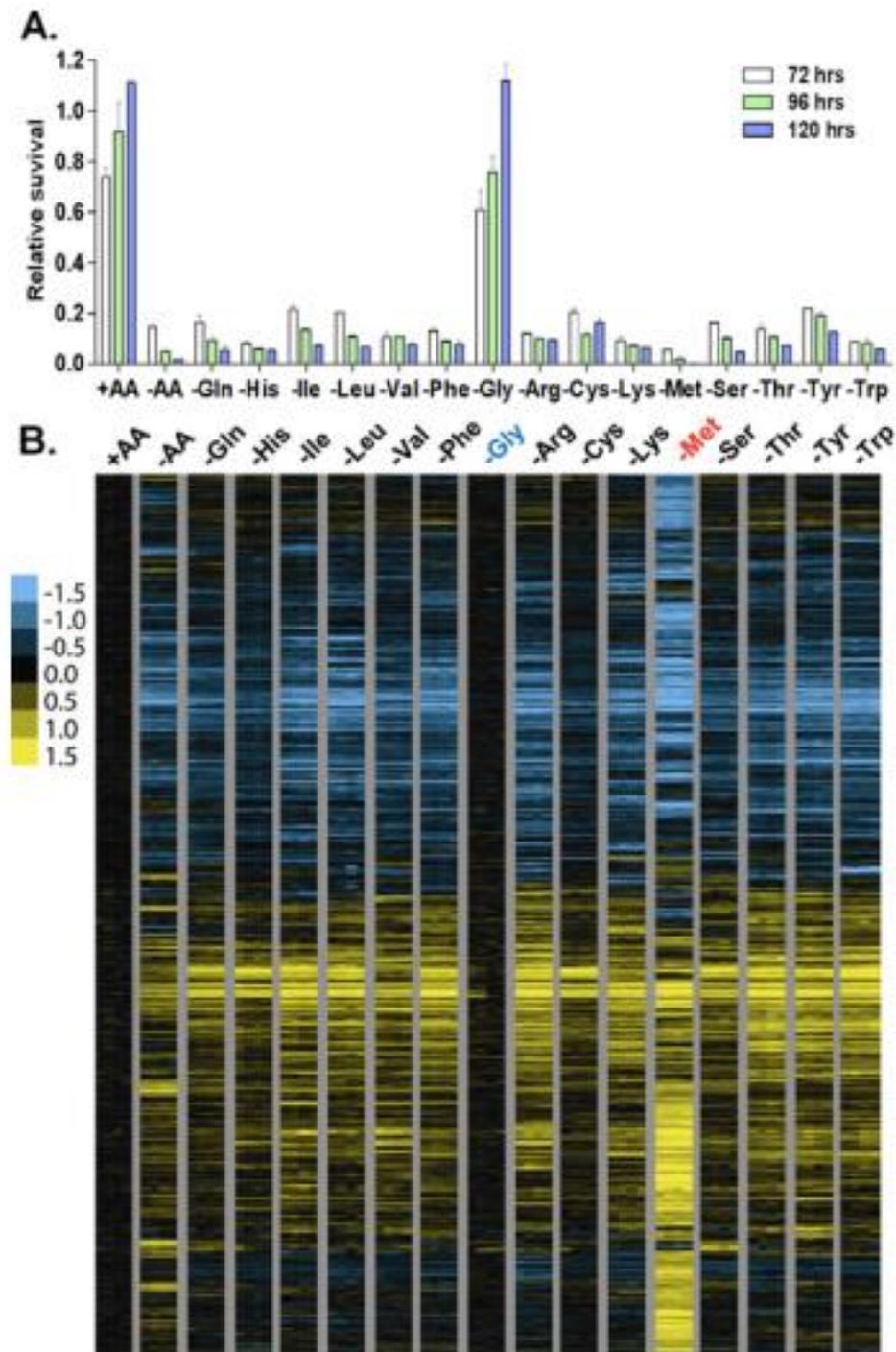


Figure 19: Réponse cellulaire et transcriptionnelle à la privation d'acides aminés individuels (Tang *et al.*, 2015).

(A) La survie cellulaire relative des cellules MCF7 selon que la totalité des acides aminés soit retirée d'un seul coup du milieu de culture ou que chaque acide aminé soit retiré séparément aux temps indiqués. (B) heat map décrivant la réponse transcriptionnelle de MCF7 selon que l'acide aminé indiqué soit manquant du milieu de culture.

Il existe un spectre de croissance cellulaire quand l'homocystéine remplace la méthionine dans le milieu de culture. La sensibilité des cellules cancéreuses à la restriction en méthionine peut être plus ou moins prononcée (Judde *et al.*, 1989), d'où la difficulté de choisir un seuil pour la méthionine dépendance. Elle est définie comme un arrêt de croissance ou une mort cellulaire lorsque l'homocystéine remplace la méthionine. Cependant, certaines lignées cellulaires ont un retard de croissance significatif dans ce milieu et peuvent être classées comme méthionine dépendantes ou non selon l'analyse des données. Si les cellules meurent ou ne poussent pas du tout, elles sont considérées comme méthionine dépendantes. Une façon d'aborder ceci est de classer les lignées cellulaires comme absolument dépendantes ou principalement dépendantes (Tang *et al.*, 2000a), bien que le problème d'un seuil standard persiste.

Une autre complication est que, lors des repassages, le phénotype de la méthionine dépendance d'une lignée cellulaire cancéreuse donnée peut changer. Fiskerstrand *et al.* ont étudié une série de passages différents de la même lignée cellulaire qui avaient des phénotypes différents de méthionine dépendance (Fiskerstrand *et al.*, 1994). Ceci pourrait expliquer pourquoi certaines lignées cellulaires sont classées comme méthionine dépendantes par certains chercheurs et méthionine indépendantes par d'autres. En fait, Tang *et al.* supposent que le changement de phénotype cellulaire explique pourquoi les lignées cellulaires ont poussé dans les milieux additionnés d'homocystéine (met-hcy +) alors qu'elles avaient été classés auparavant comme méthionine dépendantes (Tang *et al.*, 2000a).

Bien qu'il existe des différences dans la façon dont la dépendance à la méthionine est mesurée et les seuils utilisés, il est clair qu'il existe une différence dans la capacité de certaines cellules cancéreuses à se développer en milieu met-hcy+.

La première preuve de la dépendance à la méthionine dans les cellules cancéreuses a été rapportée en 1959 à partir d'études portant sur la croissance de tumeurs Walker-256 (carcinome du sein) transplantées par voie sous-cutanée chez les rongeurs Sprague-Dawley en réponse à un régime dépourvu de méthionine (Sugimura *et al.*, 1959). Une étude ultérieure sur la méthylation de l'ARNt a observé un défaut métabolique dans les cellules Walker-256 suggérant une dépendance de ces cellules à la méthionine (Buch *et al.*, 1972). Pour prouver que les cellules cancéreuses étaient méthionine dépendantes, des cellules Walker-256, de leucémie lymphatique de souris et de leucémie monocyttaire humaine ont

été cultivées dans un milieu supplémenté avec Hcy à la place de la méthionine (Met-Hcy+) (Halpern *et al.*, 1974). Le fait que les cellules malignes ne survivaient pas dans un milieu Met-Hcy + a suggéré une dépendance absolue à l'égard de la méthionine. En outre, la dépendance à la méthionine a été observée dans des cultures primaires de tumeurs fraîches provenant de patients (Guo *et al.*, 1993b).

Alors qu'initialement il était supposé que les cellules malignes méthionine dépendantes étaient incapables de méthyler l'Hcy pour former la méthionine, Hoffman et Erbe (Hoffman and Erbe, 1976) ont démontré que les cellules Walker-256 et les lignées de cellules humaines SV80 et W18VA2 transformées par SV40 pouvaient synthétiser la méthionine à partir d'Hcy à des taux au moins aussi élevés que les souches normales de fibroblastes de peau humaine MGF316 et MGF323. Ces données suggèrent que la dépendance à la méthionine peut être causée par une utilisation altérée de la méthionine par opposition à une incapacité à synthétiser la méthionine à partir de l'Hcy (Hoffman and Erbe, 1976). Dans une étude ultérieure, les cellules Walker-256, SV80 et W18VA2 ont été cultivées dans un milieu Met-Hcy+ pendant une période prolongée permettant l'isolement de cellules rares indépendantes de la méthionine (Hoffman *et al.*, 1978). La caractérisation des cultures inversées a suggéré que la synthèse de méthionine n'était pas un facteur principal de réversion de l'indépendance de la méthionine (Hoffman *et al.*, 1978). Une analyse approfondie de la réversion des cellules cancéreuses dépendantes de la méthionine a révélé qu'il était possible de choisir des révertants transformés hétérogènes en sélectionnant des cellules indépendantes de la méthionine, ce qui suggère une relation possible entre l'utilisation altérée de la méthionine et la transformation oncogène.

Les mécanismes responsables de la dépendance à la méthionine dans les lignées de cellules malignes sont partiellement connus. Les premières études ont rapporté que les cellules cancéreuses dépendantes de la méthionine peuvent synthétiser une quantité normale de méthionine endogène mais ont une capacité réduite à utiliser la méthionine endogène pour la synthèse de SAM (Coalson *et al.*, 1982). De plus, le taux de méthionine libre dans les cultures de fibroblastes humains méthionine dépendants transformés par SV40 maintenus dans un milieu Met- Hcy + est faible par rapport aux fibroblastes diploïdes humains normaux cultivés dans un milieu Met- Hcy +.(Stern *et al.*, 1983). Ces données suggèrent que la méthionine libre a été préférentiellement orientée vers la synthèse des protéines, ce qui a entraîné une synthèse plus faible de SAM (Coalson *et al.*, 1982; Stern *et al.*, 1983). Un

mécanisme possible pour réduire la méthionine libre peut être une suppression de gènes clés dans la voie de sauvetage de la méthionine.

Des études suggèrent que la perte de l'expression de MTAP impliqué dans la voie de sauvetage de la méthionine est un facteur majeur de la dépendance à la méthionine dans les cellules cancéreuses. La perte de l'expression de MTAP a été observée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses, y compris celles dérivées de carcinomes canaux primaires, de gliomes, d'ostéosarcomes, de mélanomes, de cancers du poumon non à petites cellules et de leucémies lymphocytaires aiguës à lymphocytes T (Behrmann *et al.*, 2003; Garcia-Castellano *et al.*, 2002; Komatsu *et al.*, 2008; M'Soka T *et al.*, 2000; Nobori *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1998). Le gène MTAP est situé sur le chromosome humain 9p21, à environ 100 kb du gène p16 suppresseur de tumeur qui est inactivé dans de nombreux cancers (Nobori *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1996). Plusieurs études ont rapporté que le gène MTAP est fréquemment co-supprimé avec p16 et dans certains cas avec p15 dans une variété de lignées de cellules cancéreuses et de tumeurs. Ces données suggèrent que la suppression du gène MTAP peut être simplement due à sa proximité des loci p16 et p15.

Cependant, il existe maintenant des éléments de preuve suggérant que le gène MTAP lui-même peut agir comme un suppresseur de tumeur. La perte de MTAP a été observée en l'absence de perte de p16 dans le cancer du poumon non à petites cellules (Brat *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 1998). En outre : 1) la réintroduction de MTAP dans les cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7 préalablement déficientes en MTAP inhibe leur croissance ; 2) les cellules MCF -7 qui expriment MTAP ne forment plus de tumeur lorsqu'elles sont implantées dans des souris SCID (Christopher *et al.*, 2002). Mais la suppression de MTAP n'est pas toujours une cause directe de la dépendance à la méthionine, bien que ces deux événements co-existent fréquemment. En effet, une étude de Tang et al. (Tang *et al.*, 2000a) a démontré que les cellules MCF-7, méthionine dépendantes et contenant un gène MTAP non fonctionnel, ne se développent dans un milieu Met- Hcy + après la transfection de l'ADNc normal de MTAP. Ces données suggèrent que des mutations dans des gènes autres que MTAP, intervenant dans les voies de récupération de la méthionine et/ou de synthèse de novo peuvent être impliquées dans la dépendance à la méthionine des cancers.

6.2. Contrôle des cancers méthionine dépendants par des analogues de MTA et de l'adénine

Les cellules déficientes en MTAP sont incapables de cataboliser la MTA pour générer de l'adénine et deviennent dépendantes de la synthèse de novo des purines. L'adénine joue un rôle crucial notamment dans la respiration cellulaire et la synthèse des protéines et présente une cible thérapeutique possible pour le traitement du cancer. Une étude récente a proposé une nouvelle stratégie pour tuer sélectivement les cellules tumorales déficientes en MTAP par une combinaison d'un analogue de l'adénine toxique (comme la 2,6-diaminopurine, la 6-méthylpurine ou la 2-fluoroadénine) et de MTA (Lubin and Lubin, 2009). Les cellules normales généreront de l'adénine à partir de MTA et bloqueront la conversion de l'analogue toxique en sa forme nucléotidique active, alors que les cellules tumorales déficientes en MTAP ne peuvent pas bloquer la conversion de l'analogue et sont tuées. Cependant, un nouvel essai clinique de phase II a démontré que la L-alanosine, un inhibiteur puissant de la synthèse de novo de l'adénine, était inefficace chez les patients atteints de tumeurs avancées déficientes en MTAP (Kindler *et al.*, 2009). Une explication possible du manque d'effet de la L-alanosine est que la synthèse de l'adénine à partir de MTA dans les cancers peut ne pas être limitée par l'absence de MTAP dans la cellule cancéreuse. Les tissus normaux environnants peuvent servir de source d'adénine, limitant ainsi considérablement l'efficacité de la L-alanosine. Une autre approche du blocage de la biosynthèse d'adénine dans les cancers est d'inhiber globalement la MTAP. Une étude récente de Basu *et al.* (Basu *et al.*, 2011) a démontré que l'inhibition systémique de la MTAP avec l'analogue méthylthio-DADMe-Immucillin-A (MTDIA) est efficace pour inhiber la croissance et les métastases des cancers du poumon humains dans les xénogreffes de souris .

Il existe des études suggérant que la suppression de la MTAP peut conduire à une activité accrue de l'ornithine décarboxylase (ODC) (Subhi *et al.*, 2003). L'ODC est l'enzyme limitante de la production de polyamines qui stimulent la prolifération cellulaire et donc la croissance du cancer. Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* (levures) dépourvues de MTAP ont une activité élevée d'ODC et l'introduction de MTOB -un intermédiaire du cycle de sauvatage de la méthionine- ou de MTAP réduit les niveaux d'ODC (Subhi *et al.*, 2003). De même, l'introduction de MTAP (type sauvage) dans les cellules MCF-7 déficientes en MTAP réduit considérablement l'activité ODC (Subhi *et al.*, 2003). Ces données suggèrent que d'autres

enzymes dans la voie de sauvetage de la méthionine peuvent réguler la croissance tumorale, en plus de MTAP, et nécessitent une étude plus approfondie.

6.3. Défauts dans la voie du métabolisme des folates qui peuvent contribuer au phénotype de méthionine dépendance

La dépendance à la méthionine a été liée à une réduction de l'activité MTR observée dans les cellules HTC de cancer du foie méthionine dépendantes (Kenyon *et al.*, 2002). Cependant, d'autres études ont rapporté des taux similaires de MTR dans des cellules malignes méthionine dépendantes et dans des cellules normales (Stern *et al.*, 1984). La MTR est active à condition d'utiliser le 5-méthyltétrahydrofolate (5-MTHF) comme donneur de méthyle et la cobalamine (vitamine B12) comme cofacteur (Drennan *et al.*, 1994). La synthèse de 5-MTHF à partir de 5,10-MéthylèneTHF est catalysée par la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR). Beetstra *et al.* (Beetstra *et al.*, 2008) ont rapporté que la dépendance à la méthionine des lymphocytes humains avait tendance à être plus élevée chez les individus ayant un cancer du sein (porteurs de mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2) comparativement aux sujets sains et cette dépendance à la méthionine était significativement augmentée chez les porteurs de l'allèle MTHFR 677T par rapport aux porteurs de l'allèle 677C.

Cependant, dans des études utilisant des cellules Walker-256 dépendantes de la méthionine, le 5-MTHF n'a eu aucun effet sur la dépendance à la méthionine, ce qui suggère que MTHFR ne contribue pas à ce phénotype dans ces cellules (Tisdale, 1980a), mais il convient de noter qu'il n'y a pas de données sur les polymorphismes MTHFR dans les cellules Walker-256. L'effet du polymorphisme C677T sur l'activité MTHFR est modifié par la concentration ou l'apport de riboflavine (vitamine B2) qui est un cofacteur de MTHFR. La culture des lymphocytes humains dans un milieu riche en riboflavine neutralise l'impact du polymorphisme MTHFR C677T et l'apport élevé en riboflavine *in vivo* empêche l'élévation de l'Hcy plasmatique chez les porteurs homozygotes de l'allèle T de MTHFR.

L'altération du métabolisme de la cobalamine abaisse l'activité MTR et pourrait constituer un mécanisme de méthionine dépendance comme ceci a été démontré dans les cellules de mélanome et de gliome (Fiskerstrand *et al.*, 1994; Liteplo *et al.*, 1991). Les cellules MeWo-LC1 sont méthionine dépendantes et présentent une inactivation de MMACHC (methylmalonic aciduria cobalamin deficiency cblC type with homocystinuria) due à la

méthylation d'un îlot CpG à l'extrémité 5' du gène. La méthionine dépendance est supprimée par la transfection d'un gène MMACHC type sauvage. Cependant, une étude de Watkins qui a utilisé un panel de 14 lignées de cellules tumorales méthionine dépendantes, incluant les cellules MeWo-LC1, a retrouvé une altération du métabolisme de la cobalamine uniquement dans les cellules MeWo-LC1 et pas dans les autres lignées. Ceci suggère qu'il existe de multiples causes de la dépendance à la méthionine et que l'inactivation du locus *cb1C* n'est pas la cause exclusive de ce phénotype (Loewy *et al.*, 2009).

Il a été suggéré que le polymorphisme MTR A2756G constitue un risque de cancer du sein notamment chez les porteuses des mutations inactivatrices BRCA1 et BRCA2 rencontrées dans 5 à 10% des cancers du sein (Beetstra *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009). Une méta-analyse a suggéré que l'association entre le polymorphisme MTR A2756G et le cancer du sein était spécifique aux femmes européennes et qu'elle n'est pas avérée dans d'autres groupes ethniques (Lu *et al.*, 2010). La plupart des études suggèrent que les individus avec l'allèle G (allèle mineur) ont des taux d'Hcy plasmatiques plus faibles que ceux qui ont l'allèle A (allèle majeur) (Sharp and Little, 2004). Les porteurs de l'allèle G ont également moins de défauts chromosomiques et une durée de vie plus longue (Linnebank *et al.*, 2005). Il n'est pas clair si ce polymorphisme favorise la synthèse de novo de la méthionine (et abaisse les concentrations d'Hcy) et si par conséquent il contribue au phénotype de méthionine dépendance dans le cancer du sein.

La dépendance à la méthionine des cellules cancéreuses peut être due à une demande accrue de méthionine ou à un défaut de synthèse métabolique. L'exigence accrue pour la méthionine dans les cellules tumorales peut être due à une activité élevée de transméthylation et peut conduire à la repression par hyperméthylation de gènes clés impliqués dans l'inhibition de la croissance et l'apoptose (Stern and Hoffman, 1984). L'observation que les cellules tumorales sont incapables de maintenir un niveau élevé de transméthylation dans un milieu Met- Hcy + suggère que ces cellules dépendent de la méthionine exogène (Judde *et al.*, 1989). Ainsi, certaines cellules tumorales semblent incapables d'activer la MTR dans un milieu Met- Hcy + et par conséquent ne peuvent pas répondre à une activité élevée de transméthylation, mais le mécanisme de cette incapacité reste inconnu.

6.3.1. Modèles cellulaires et animaux pour une restriction en méthionine

Des souris « nude » injectées par des cellules tumorales sarcoma de Yoshida et nourries avec un régime sans méthionine et sans homocystéine ont montré un blocage du cycle cellulaire spécifique de la tumeur (Guo *et al.*, 1993a). Ce blocage du cycle cellulaire est caractérisé par l'augmentation de la teneur en ADN, ce qui suggère un blocage pré-mitotique. Dans le groupe de souris soumis au régime sans méthionine pendant 30 jours, une régression de la tumeur a été observée ainsi qu'une survie prolongée.

Poirson-Bichat *et al.* ont utilisé la restriction en méthionine ou ont administré des analogues de la méthionine (éthionine et trifluorométhylhomocystéine) pour inhiber la croissance des lignées cellulaires de gliome en culture (Poirson-Bichat *et al.*, 2000). La restriction de la méthionine a induit l'arrêt en G1 tandis que les analogues de la méthionine ont induit un arrêt en G2. Lorsque des xénogreffes de gliome humain ont été greffées chez des souris « nude », la restriction en méthionine a induit des effets antitumoraux potentialisés par les analogues de la méthionine (Poirson-Bichat *et al.*, 2000).

6.3.2. La restriction en méthionine et le contrôle de la croissance du cancer

L'observation selon laquelle certaines tumeurs humaines sont dépendantes de la méthionine *in vivo* présente une cible thérapeutique dans le contrôle de la croissance du cancer. Comme la méthionine provient principalement des aliments, une stratégie visant à réduire les taux de méthionine *in vivo* est de restreindre ou d'éliminer la méthionine du régime alimentaire. Lorsque la méthionine alimentaire est restreinte, la méthionine déjà dans le système est conservée, vraisemblablement par une réduction de la synthèse de la cystathionine dans la voie de la transsulfuration, ce qui entraîne une augmentation temporaire des niveaux de Hcy totale pour la synthèse de méthionine. Par conséquent, il existe souvent un décalage entre la restriction diététique de la méthionine et la réduction des taux sériques de méthionine.

Chez les animaux, la restriction de la méthionine peut altérer la croissance du cancer et la carcinogénèse. Malgré ces données, il convient de noter que l'utilisation prolongée de régimes extrêmement déficients en méthionine et ses précurseurs pourrait être mortelle. Par conséquent, il faut accorder plus d'attention pour déterminer la limite sûre et tolérable de la restriction de la méthionine.

Les changements de style de vie intenses combinés à un régime restreint par la méthionine peuvent réduire le risque de progression de certains cancers de la prostate. Une

combinaison de la restriction diététique de la méthionine et de la restriction calorique, en limitant le glucose, peut s'avérer bénéfique dans le contrôle de la croissance du cancer

6.3.3. La restriction en méthionine et la chimiothérapie

La restriction en méthionine a été étudiée comme une méthode pour augmenter l'efficacité de la chimiothérapie. Elle peut améliorer les effets de certains agents chimiothérapeutiques car il existe une interruption du cycle cellulaire pendant la restriction de la méthionine, mais cet effet est réversible; donc, lorsque l'apport de méthionine est restauré, les cellules ont tendance à rentrer de nouveau dans le cycle cellulaire (Stern and Hoffman, 1986).

Tan et al. ont traité des lignées cellulaires de cancer du côlon dépendantes de la méthionine avec de la méthioninase recombinante, une enzyme qui détruit la méthionine, en combinaison avec l'agent chimiothérapeutique cisplatine (Tan *et al.*, 1999). Les lignées cellulaires ont répondu de manière synergique au traitement des deux agents. De même, la méthioninase a inhibé la croissance de ces lignées cellulaires cancéreuses quand elles ont été injectées dans des souris « nude ».

Cao et al. ont transformé des biopsies de cancer gastrique primaire et de muqueuse gastrique normale, en suspensions monocellulaires puis les ont cultivées dans des milieux met-hcy+ ou met+hcy- (Cao *et al.*, 2002). Dans le milieu met-hcy+, le nombre de cellules cancéreuses gastriques était réduit, suggérant que ces cellules étaient en train de mourir. La plupart des cellules qui ont survécu étaient en phase S. Les cellules épithéliales de la muqueuse gastrique se multiplient normalement dans un milieu met-hcy+. Cinq agents de chimiothérapie différents ont été testés (adriamycine, cisplatine, 5'fluorouracile, mitomycine C, méthotrexate) et chacun arrête la croissance des cellules cancéreuses plus efficacement si son utilisation est combinée avec une restriction en méthionine.

La restriction en méthionine en conjonction avec l'administration de divers agents chimiothérapeutiques a retardé la croissance des cellules ou a diminué la taille de la tumeur chez les souris « nude ». En 1995, Goseki et al. ont réalisé un essai clinique incluant 14 patients atteints de cancer gastrique avancé (Goseki *et al.*, 1995). Les patients étaient traités avec le 5' fluorouracile et sept jours avant la résection chirurgicale, ils ont été divisés en 2 groupes : un groupe recevant une nutrition parentérale avec méthionine et l'autre sans. L'étude des coupes histologique a montré que les patients recevant une nutrition

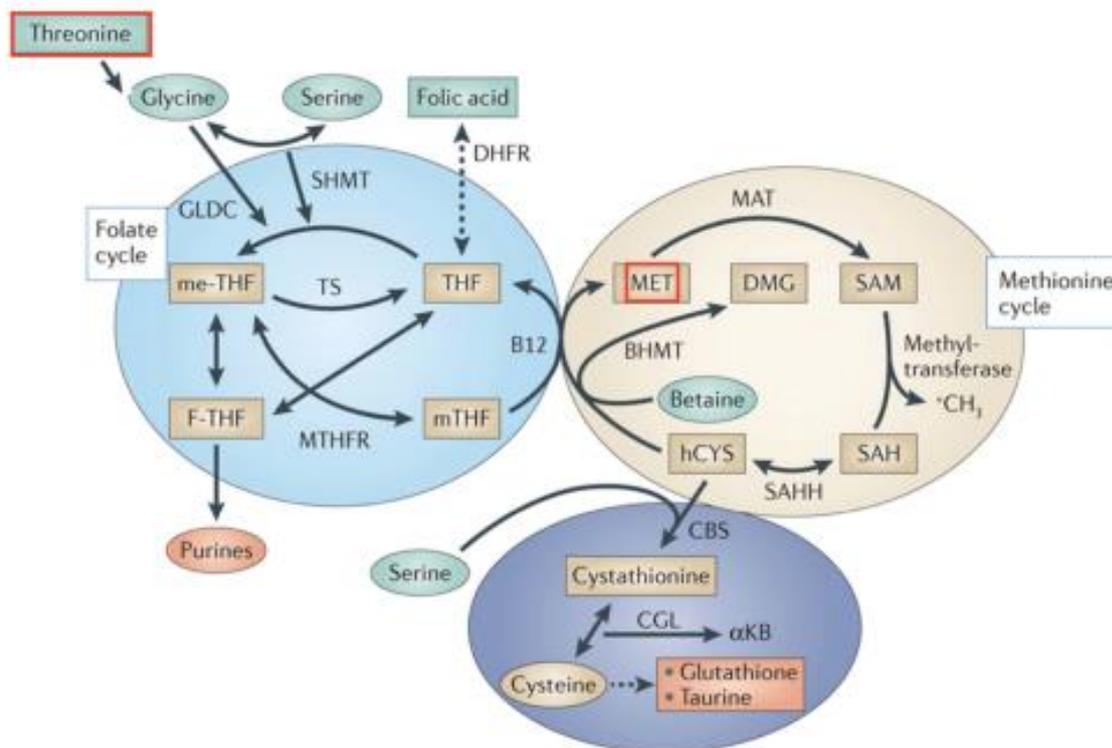
parentérale sans méthionine avaient une régression tumorale plus prononcée que les patients recevant une nutrition parentérale avec méthionine (Goseki *et al.*, 1995).

Tan et al. ont constaté que l'utilisation de la méthioninase recombinante chez les patients atteints d'un cancer avancé ne provoque pas d'effets secondaires et qu'elle entraîne pas une diminution de la concentration sérique de méthionine (Tan *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1996). Les travaux suivants ont consisté à modifier la méthioninase recombinante afin d'optimiser son action : clonage dans une construction rétrovirale (Miki *et al.*, 2000), fixation au polyéthylène glycol (PEGylation) pour réduire l'antigénicité (Yang *et al.*, 2004), adjonction du PLP (vitamine B6) pour augmenter la stabilité (Yang *et al.*, 2004), addition d'un agent réducteur dithiothreitol pour augmenter l'efficacité (Takakura *et al.*, 2006).

6.4. La méthionine dépendance et les cellules souches

Les cellules souches embryonnaires utilisent un mode unique de métabolisme des acides aminés pour maintenir leur état épigénétique pluripotent (Shyh-Chang *et al.*, 2013a). Les cellules souches embryonnaires de souris ont été testées pour leur dépendance vis à vis de chacun des 20 acides aminés, et il a été constaté que seule la restriction en thréonine diminuait leur croissance de manière unique (Wang *et al.*, 2009). Récemment, le métabolisme de la méthionine a été décrit comme étant essentiel au maintien des propriétés des cellules souches embryonnaires humaines (Shiraki *et al.*, 2014). Comme déjà vu précédemment, le métabolisme des monocarbone met en scène une interaction étroite entre les cycles de l'acide folique et de la méthionine et intègre l'état nutritionnel défini par les métabolismes des acides aminés, du glucose et des vitamines et il génère des produits divers nécessaires à la biosynthèse des lipides, des nucléotides et des protéines, au maintien de l'état redox ainsi que des substrats pour les réactions de méthylation (Figure 20) (Locasale, 2013).

La thréonine est convertie en glycine par la thréonine déshydrogénase (TDH), et la glycine est ensuite clivée par la glycine décarboxylase (GLDC). Un des produits de ce clivage sert à générer le 5,10-méthylène-tetrahydrofolate. Ainsi, dans les cellules souches embryonnaires de souris, TDH et GLDC régulent la synthèse du 5-méthyl-tétrahydrofolate, modulant ainsi le métabolisme de la SAM et contrôlant la tri-méthylation de l'histone H3K4 (Shyh-Chang *et al.*, 2013b).



Modified from *Nat Rev Cancer* 13(8) 572-583. 2013

Figure 20: le métabolisme des monocarbone.

Le métabolisme des monocarbone fait interagir les cycles de l'acide folique et de la méthionine et intègre l'état nutritionnel. Généralement, la thréonine et la méthionine sont essentielles pour la maintenance des cellules souches embryonnaires de souris et humaines. THF : tetrahydrofolate, me-THF : 5,10-méthylène-THF, SHMT : serine hydroxyméthyl transferase, mTHF : 5-méthyltetrahydrofolate, MTHFR : méthylène-tetrahydrofolate, F-THF : 10-formyltetrahydrofolate, hCYS : homocysteine, B12 : vitamine B12, MET : méthionine, MAT : méthionine adényltransferase, SAM : S-adenosylméthionine, SAH : S-adenosylhomocysteine, SAHH : S-adenosyl homocysteine hydrolase, CBS : cystathionine synthase, CGL : cystathionine lyase, $\alpha\text{-KB}$: α -ketobutyrate, BHMT : betaine hydroxyméthyltransferase, DHFR : dihydrofolate reductase, DMG : diméthylglycine, GLDC : glycine decarboxylase, TS : thymidylate synthase.

Dans les cellules souches humaines, la restriction en méthionine entraîne une diminution rapide de la SAM intracellulaire, qui déclenche l'activation de la signalisation MAPK p53-p38, réduit l'expression de NANOG et facilite l'entrée des cellules souches embryonnaires humaines dans un état « poisé » qui leur ouvre la possibilité de se différencier ; d'ailleurs, une différenciation dans les trois couches germinales est déclenchée si la restriction en

méthionine se prolonge (Shiraki *et al.*, 2014). Récemment, le métabolisme de la serine, acide aminé qui cède le groupement monocarboné au THF et qui est donc responsable de la formation de méthyltetrahydrofolate, a été jugé essentiel dans la biologie du cancer (DeBerardinis, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Le métabolisme de la sérine occupe une place prépondérante dans la génération de NADPH (Figure 21) (Fan *et al.*, 2014). La dérégulation du métabolisme des folates entraîne une diminution des niveaux cellulaires de NADPH / NADP⁺ et une baisse du pouvoir réducteur, ce qui augmente la sensibilité des cellules au stress oxydatif (Fan *et al.*, 2014). L'étude de la voie des monocarbones dans les cellules souches peut élargir notre compréhension du rôle des nutriments dans le métabolisme du cancer.

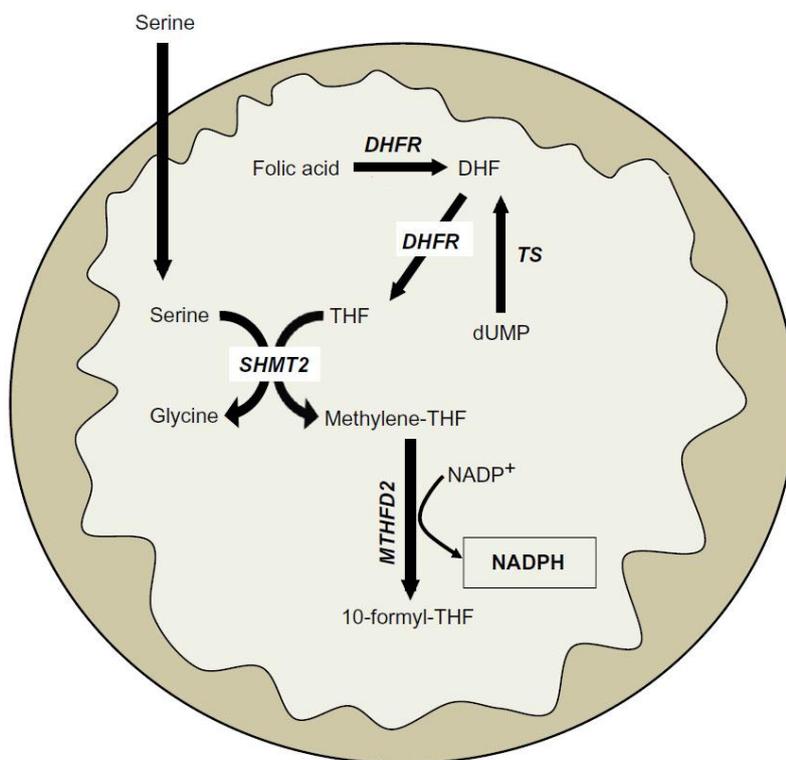


Figure 21: la voie de catabolisme de la sérine (Chakrabarti *et al.*, 2015)

La voie du métabolisme de la sérine mitochondriale soulignant la production de NADPH à partir de la sérine et de l'acide folique par le MTHFD2 mitochondrial.

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; MTHFD2, methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; THF, tetrahydrofolate; DHF, dihydrofolate; DHFR, dihydrofolate reductase; PEM, pemetrexed; MTX, methotrexate; dUMP, deoxyuridine monophosphate; TS, thymidylate synthase; SHMT2, serine hydroxymethyltransferase 2.

La restriction en méthionine peut être une stratégie efficace pour éliminer les cellules souches cancéreuses. En effet, la formation des mammosphères dérivées des cellules MCF7 est fortement inhibée par la restriction en méthionine puis restaurée à son niveau normal après addition de méthionine dans le milieu de culture (Figure 22). L'effet de la méthionine est progressif selon la dose jusqu'à une concentration optimale égale à 0,01 mM (10 μ M). Il est remarquable que la formation des mammosphères soit au moins 18 fois plus sensible à l'addition de méthionine que la croissance des cellules MCF7 adhérentes (monolayer ou monocouche). Plus spécifiquement, l'addition de 0,001 mM de méthionine dans le milieu de culture stimule la formation des mammosphères de 22 fois, alors que la prolifération des cellules MCF7 monocouche n'est multipliée que par un facteur 1,2 (Figure 22). Des résultats similaires ont également été obtenus à des concentrations plus élevées de méthionine (0,01 et 0,1 mM) (Lamb *et al.*, 2015).

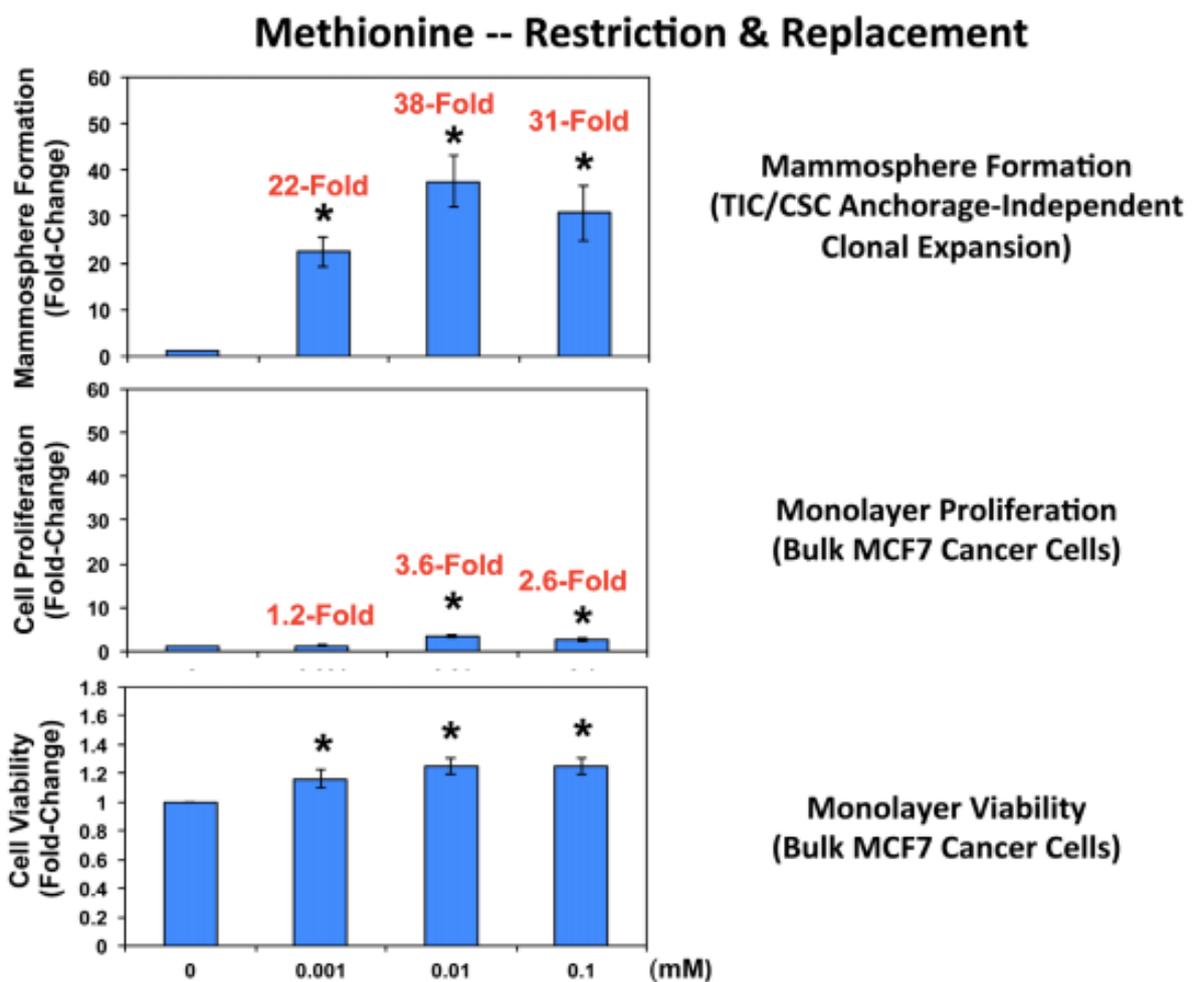


Figure 22: La restriction en méthionine réduit de manière significative la formation des mammosphères dans les cellules MCF7.

La formation des mammosphères est inhibée par la carence en méthionine; elle est rétablie à des niveaux normaux par l'addition dose-dépendante de méthionine dans le milieu de culture, l'effet optimal se produisant à 0,01 mM. Des expériences parallèles avec des cellules MCF7 cultivées sous forme de cultures monocouches sont présentées à titre de comparaison. Fait intéressant, la formation des mammosphères est de 10 à 18 fois plus sensible à la restriction en méthionine que la croissance des cellules adhérentes monocouche.

En outre, les cellules MCF7 monocouche ont été prétraitées avec la méthionine à différentes concentrations (0, 0,001, 0,01 et 0,1 mM) pendant 4 jours puis trypsinées et ré-ensemencées pour tester la formation des mammosphères dans un milieu non-adhérent contenant 0,1 mM méthionine. Les résultats ont montré que la formation des mammosphères est 3 fois plus élevée quand les cellules MCF7 ont été incubées avec 0.1 mM de méthionine que quand elles ont été cultivées dans un milieu sans méthionine (Figure 23). Fait important, la restriction en méthionine n'affecte pas la viabilité des cellules MCF7 adhérentes monocouche (Figure 23). Ainsi, la restriction en méthionine réduit le caractère « stemness » des « tumor spheres » déjà formées mais en plus elle réduit le caractère « stemness » des cellules monocouche dans le sens où elle diminue le potentiel de ces cellules à produire des « tumor spheres » (Lamb *et al.*, 2015).

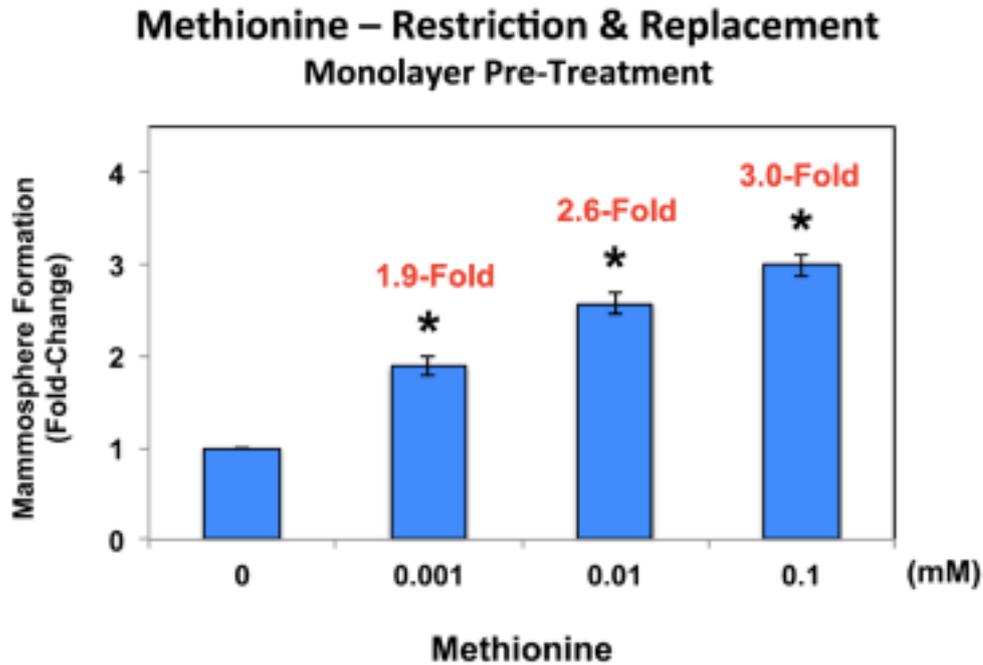


Figure 23: L'exposition des cellules MCF7 monocouches à une restriction en méthionine réduit de manière significative la formation des mammosphères.

Les cellules MCF7 monocouche ont été exposées à différentes concentrations de méthionine (0, 0,001, 0,01 et 0,1 mM) pendant 4 jours, puis elles ont été trypsinées et re-ensemencées pour tester la formation des mammosphères. La formation des mammosphères est réduite de 3 fois quand la concentration de méthionine dans le milieu de culture diminue de 0.1 à 0 mM. Ainsi, la restriction en méthionine réduit le potentiel des cellules MCF7 monocouche à former des "tumor spheres".

Objectifs d'étude

Parmi les aminoacides, la méthionine possède une place à part : elle est nécessaire à l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction et elle joue un rôle singulier dans la régulation de l'expression des gènes.

Les cellules souches embryonnaires ont besoin de méthionine pour maintenir leur pluripotence alors que les cellules différenciées utilisent de faibles concentrations de méthionine et leur croissance n'est pas affectée par la restriction en méthionine.

Certains cancers sont méthionine dépendants. L'action de la méthionine est ambivalente puisqu'aussi bien la restriction que la surcharge en méthionine pourraient lutter contre la prolifération tumorale.

Les cellules souches cancéreuses représentent une faible proportion parmi les populations cellulaires dans une tumeur. Elles sont pluripotentes et capables de s'auto-renouveler. Elles sont résistantes au traitement et peuvent régénérer la tumeur entière. Elles sont méthionine dépendantes et présentent un phénotype différent des cellules adhérentes monocouche différenciées.

L'objectif de ce travail est de caractériser les programmes transcriptionnels différents entre les cellules souches cancéreuses et les cellules adhérentes monocouche puis d'identifier les voies métaboliques qui pourraient expliquer pourquoi la méthionine est nécessaire à la reprogrammation des cellules vers un état indifférencié.

Résultats

1. Caractérisation des “tumor spheres” dérivées des cellules de glioblastome U251 versus cellules adhérentes monocouche (monolayer)

1.1. Conditions de culture des « tumor spheres » et des cellules adhérentes

Les «tumor spheres» se forment dans des conditions de croissance non-adhérente, en ensemencant les cellules dans des plaques 6 puits « coatées » avec du méthacrylate et en les cultivant dans un milieu DMEM-F12 (Annexe 1) sans sérum de veau foetal, supplémenté avec B27 (Annexe 2), EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) et Peniciline Streptomycine 1%. Les « tumor spheres » apparaissent comme des sphères volumineuses en suspension. Les cellules adhérentes sont cultivées sur plaques standard (non coatées) dans un milieu DMEM-F12, avec Serum de Veau Foetal 10%, Peniciline Streptomycine 1%.

Les cellules ont été cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C à une pression atmosphérique contenant 5% de dioxyde de carbone. Après 3 passages successifs, seules les sphères de diamètre > 50 µm ont été prises en compte. Quatre photos, ayant la même aire chacune, de 4 sphères situées dans des régions différentes du même puits ont été prises avec une MoticamX (Moticeurope S.L.U). Le nombre total de cellules participant à la formation des sphères dans un puits donné a été calculé selon la formule suivante: nombre de cellules comptées dans les 4 photos divisé par 4 et multiplié par 7,73 (7,73 est égal au ratio : aire totale du puits / aire moyenne des photos). Toutes les expérimentations portant sur les « tumor spheres » ont été répétées trois fois de façon indépendante (triplicates).

1.2. La composition des milieux de culture « tumor spheres » et cellules adhérentes.

Le milieu de culture des cellules adhérentes contient du sérum de veau foetal (SVF) mais pas le milieu des « tumor spheres ». Afin d'écartier l'hypothèse d'un stress métabolique causé par des concentrations différentes d'acides aminés ou de vitamine B12 et folates et pouvant altérer la réponse transcriptionnelle, nous avons mesuré la concentration de ces composés dans les milieux de culture des « tumor spheres » et des cellules adhérentes.

Aucune différence significative n'a été retrouvée pour les folates et la vitamine B12 (tableau 4). Concernant les acides aminés, la majorité d'entre eux présentent des concentrations similaires dans les 2 milieux de culture (tableau 5). Par exemple, la concentration de la méthionine est égale à 103 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des « tumor spheres » et 122 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des cellules adhérentes. Seuls le glutamate, la glutamine et l'alanine présentent des concentrations éloignées. La concentration de l'acide glutamique est égale à 57 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des « tumor spheres » et 182 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des cellules adhérentes. La concentration de la glutamine est égale à 0 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des « tumor spheres » et 70 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des cellules adhérentes. La concentration de l'alanine est égale à 53 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des tumor spheres et 234 $\mu\text{mol/L}$ dans le milieu des cellules adhérentes. Il faut noter que dans les cellules, la glutamine est formée à partir de l'acide glutamique grâce à l'action de la glutamine synthétase donc il existe une production de glutamine dans les « tumor spheres ». Il existe, par ailleurs, une interconversion entre alanine et glutamate catalysée par l'alanine aminotransférase. Nous déduisons que les 3 acides aminés, glutamate, glutamine et alanine doivent être présents dans les « tumor spheres » même si leurs concentrations sont sans doute inférieures à celles des cellules adhérentes.

Tableau 4: les concentrations mesurées de B12, Folates et méthionine dans les milieux de culture des "tumor spheres" et cellules adhérentes

	Milieu tumor sphere	Milieu cellules adhérentes
B12	$6,6 * 10^4 \text{ pmol/L}$	$9,2 * 10^4 \text{ pmol/L}$
Folates	2,4 μM	2,2 μM

Tableau 5 : Dosage des acides aminés dans les milieux des « tumor spheres », cellules adhérentes et SVF par chromatographie liquide sur JEOL, service Biochimie Biologie moléculaire au CHU Brabois.

		Milieu tumor spheres	Milieu cellules adhérentes	SVF
TAU	μmol/L	2	20	188
ASP	μmol/L			
HPRO	μmol/L	0	0	0
THR	μmol/L	480	507	515
SER	μmol/L	266	349	998
ASN	μmol/L	55	65	158
AGLU	μmol/L	57	182	1311
GLN	μmol/L	0	70	751
PRO	μmol/L	155	219	758
GLY	μmol/L	267	375	1251
ALAN	μmol/L	53	234	1915
CITRUL	μmol/L	0	15	160
AAB	μmol/L	2	7	52
VAL	μmol/L	469	526	846
CYS/2	μmol/L	211	233	31
MET	μmol/L	103	122	204
ILEU	μmol/L	432	461	521
LEU	μmol/L	472	578	1357
TYR	μmol/L	235	267	440
PHE	μmol/L	227	273	575
HCYS	μmol/L	0	1	20
ORN	μmol/L	14	42	393
LYS	μmol/L	513	594	1086
HIS	μmol/L	160	171	278
3MH	μmol/L	0	9	105
TRP	μmol/L	28	53	128
ARG	μmol/L	725	777	788

1.3. Certaines cellules tumorales forment les « tumor spheres » plus facilement que d'autres

La formation des « tumor spheres » a été testée dans plusieurs lignées cellulaires : A549 (cancer de poumon), HCT116 (cancer du colon) et U251 glioblastome (Figures 24 et 25). Dans nos mains, la lignée U251 est apparue comme la plus propice à la formation des « tumor spheres ».

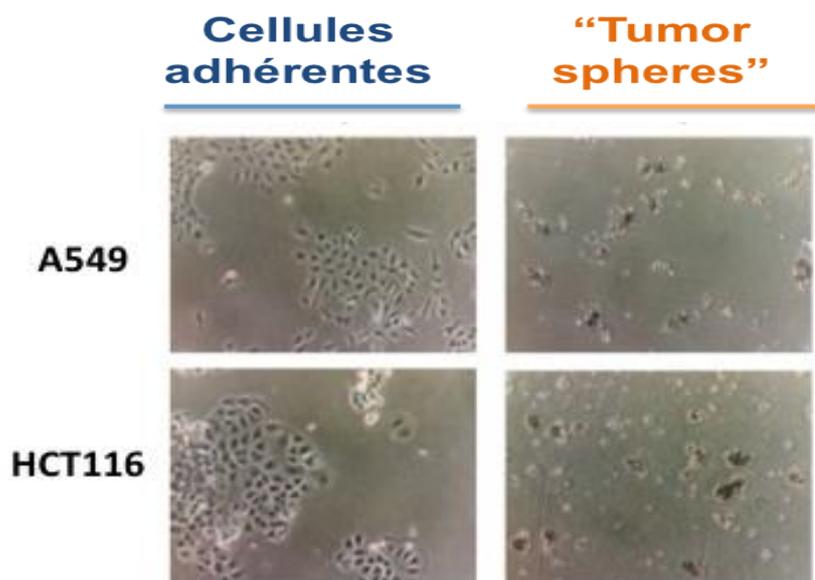


Figure 24: Formation des « tumor spheres » dérivées des lignées cellulaires de cancer du poumon A549 et de cancer du colon HCT116

Dans nos mains, les cellules A549 et HCT116 ne se sont pas révélées idéales pour la formation des « tumor spheres ». Le diamètre des sphères est resté < 50 μm .

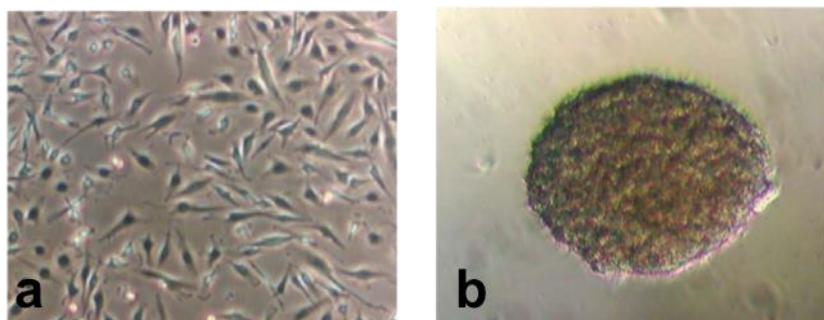


Figure 25: Formation des « tumor spheres » dérivées de la lignée cellulaire U251 de glioblastome.

a. les cellules adhérentes s'étalent sur toute la surface de culture b. les « tumor spheres » forment des sphères tridimensionnelles flottantes, en suspension, de diamètre > 50 µm.

1.4. La formation des tumor spheres est fonction de l'agressivité de la tumeur.

La formation des « tumor spheres » a été testée sur 2 lignées cellulaires supplémentaires, lomn Lee et Ben men (méningome de haut et de bas grade, respectivement) en utilisant les mêmes conditions de culture que celles pour les cellules U251. Le nombre total de sphères formées est beaucoup plus élevé dans les méningomes de haut grade que dans les méningomes de bas grade. Ceci suggère que la formation des « tumor spheres » est fonction de l'agressivité de la tumeur, plus la tumeur est agressive plus les « tumor spheres » sont nombreuses (Figure 26).

lomn lee méningome haut grade



Ben men méningome bas grade



Figure 26: la formation des tumor spheres est fonction de l'agressivité de la tumeur

La formation des tumor spheres dans les méningomes de haut grade (lomn Lee) est beaucoup plus importante que dans les méningomes de bas grade (Ben men).

1.5. Les tumor spheres sont pluripotentes

Les « tumor spheres » affichent un caractère « stem-like » illustré par la surexpression des gènes de la pluripotence Sox2, Nanog et Oct4 comme ceci est démontré par les RT-qPCR (Figure 27) et l'immunofluorescence (Figure 28). De plus, les « tumor spheres » présentent une surexpression des Arginine Protéine Methyltransférases, Carm1 et Prmt1, qui facilitent la pluripotence et empêchent la différenciation, ainsi qu'une surexpression de MTR (Méthionine Synthase) et MTRR (Méthionine Synthase réductase) qui sont 2 enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine. A noter que les images prises au microscope confocal montrent que Nanog et MTR sont co-localisés ce qui suggère que les réactions de méthylation sont nécessaires au maintien de la pluripotence (Figure 28).

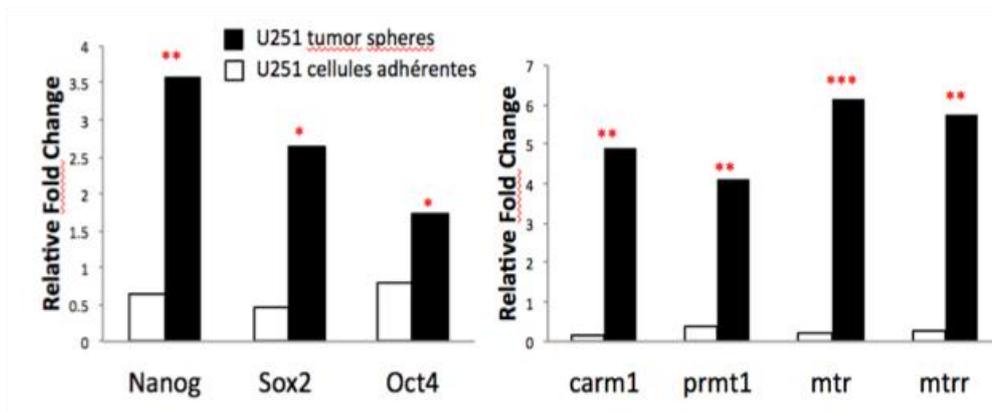


Figure 27: Mesure de l'expression des gènes par RT-PCR et normalisation sur la moyenne géométrique de l'expression des gènes de référence TBP, RPL13a et HMBS ** p < 0.01, * p < 0.05

Les gènes Nanog, Sox2, Oct4, Carm1, Prmt1, mtr et mtrr sont sur-exprimés dans les U251 tumor spheres comparativement aux cellules U251 adhérentes monocouche. Les expressions de Nanog, Sox2 et Oct4 sont multipliées par un facteur 3,5, 2,5 et 1,5, celles de Carm1 et Prmt1 par un facteur 5 et 4 et celles de MTR et MTRR par un facteur 6 et 5,5, respectivement.

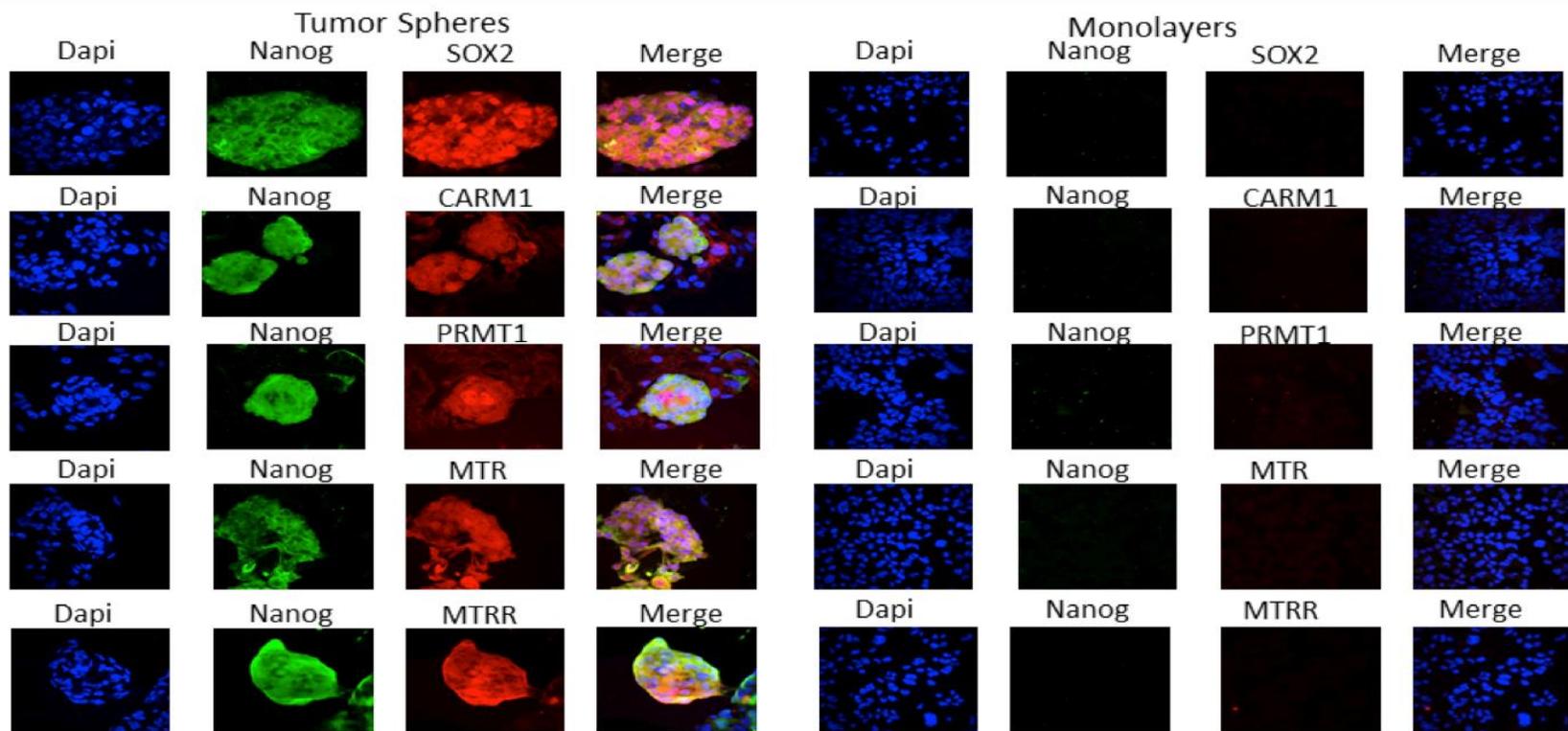


Figure 28: les gènes de pluripotence et les enzymes impliquées dans le cycle de la méthionine sont sur-exprimés et colocalisés dans les tumor spheres

Les « tumor spheres » et les cellules adhérentes monocouche sont marquées avec un anticorps anti-Nanog couplé à l'Alexa 488 (vert), avec les anticorps Sox2, Carm1, Prmt1, MTR ou MTRR couplés à l'Alexa 594 (rouge) et avec DAPI (bleu) marquant le noyau. Les images confocales du co-immunomarquage entre Nanog (gène de pluripotence) et Sox2 (gène de pluripotence) montre une surexpression de ces 2 gènes dans les « tumor spheres » par rapport aux cellules adhérentes. De même les images confocales du co-

immunomarquage entre Nanog et Carm1, Prmt1, MTR, MTRR montrent une surexpression de ces gènes dans les « tumor spheres » par rapport aux cellules adhérentes. De plus, il y a une colocalisation entre MTR/ MTRR et Nanog notamment, ce qui suggère que les réactions de méthylation sont nécessaires à la pluripotence.

L'immunohistochimie, réalisée sur des coupes transversales de culot cellulaire présente un avantage sur l'immunofluorescence parce qu'elle permet d'explorer l'expression des protéines dans l'ensemble des cellules composant la sphère, que ce soient les cellules à la surface ou au centre. Plusieurs culots cellulaires de « tumor spheres » ont été préparés puis des coupes transversales ont été réalisées et analysées par immunohistochimie avec les anticorps anti-Sox2, anti-Nanog et anti-CD133. Les résultats montrent que ces protéines sont sur-exprimées dans les « tumor spheres » (comparativement aux cellules adhérentes) de façon uniforme dans les sphères (Figure 29). La protéine CD-133 est un marqueur des cellules souches qui génèrent les lignages cellulaires du système nerveux central et elle est couramment utilisée pour détecter les « tumor spheres » obtenues à partir de cellules de glioblastome (Uchida *et al.*, 2000). De plus, l'immunohistochimie a révélé que les protéines KI67 et MCM6 (qui sont des marqueurs de prolifération) sont sous-exprimées dans les « tumor spheres », comparativement aux cellules adhérentes, (Figure30), ce qui est conforme à une des propriétés essentielles des « tumor spheres » qui sont des cellules quiéscentes avec un cycle cellulaire ralenti.

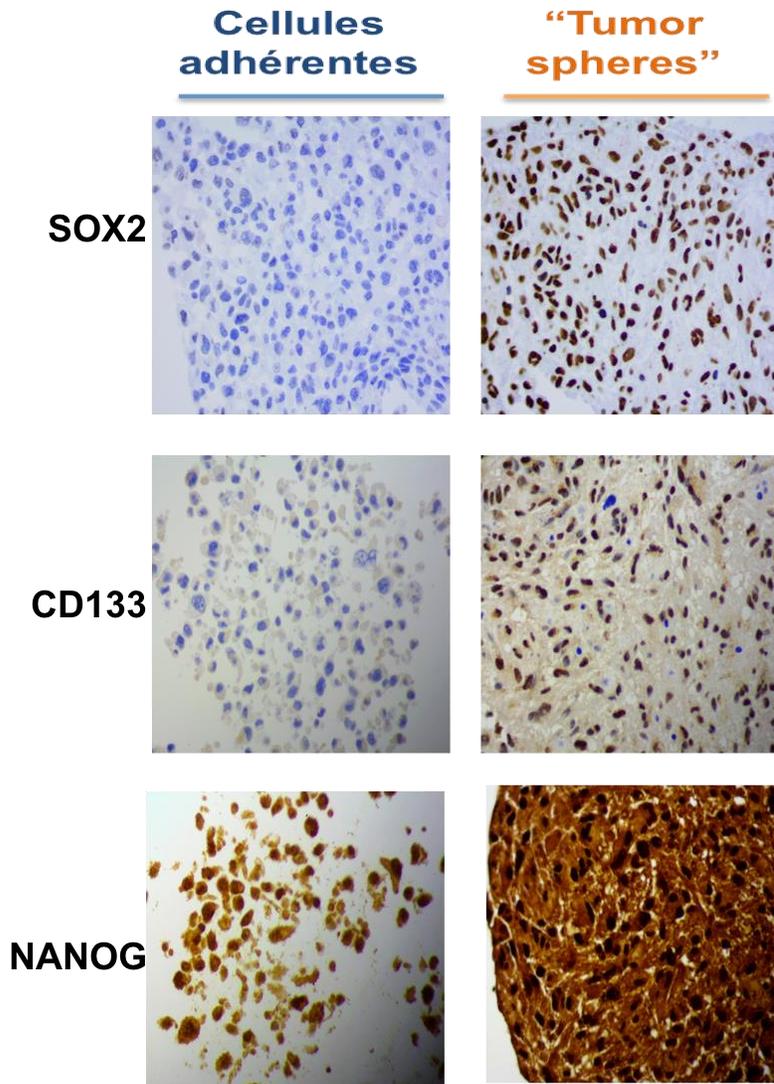


Figure 29: Les marqueurs de pluripotence Sox2, Nanog et le marqueur des cellules souches CD133 sont sur-exprimés dans les tumor spheres

L'immunocytochimie a été réalisée après fixation des « tumor spheres » et des cellules adhérentes par la formaline puis intégration dans la paraffine, en utilisant des anticorps dirigés contre Sox2, Nanog et CD133.

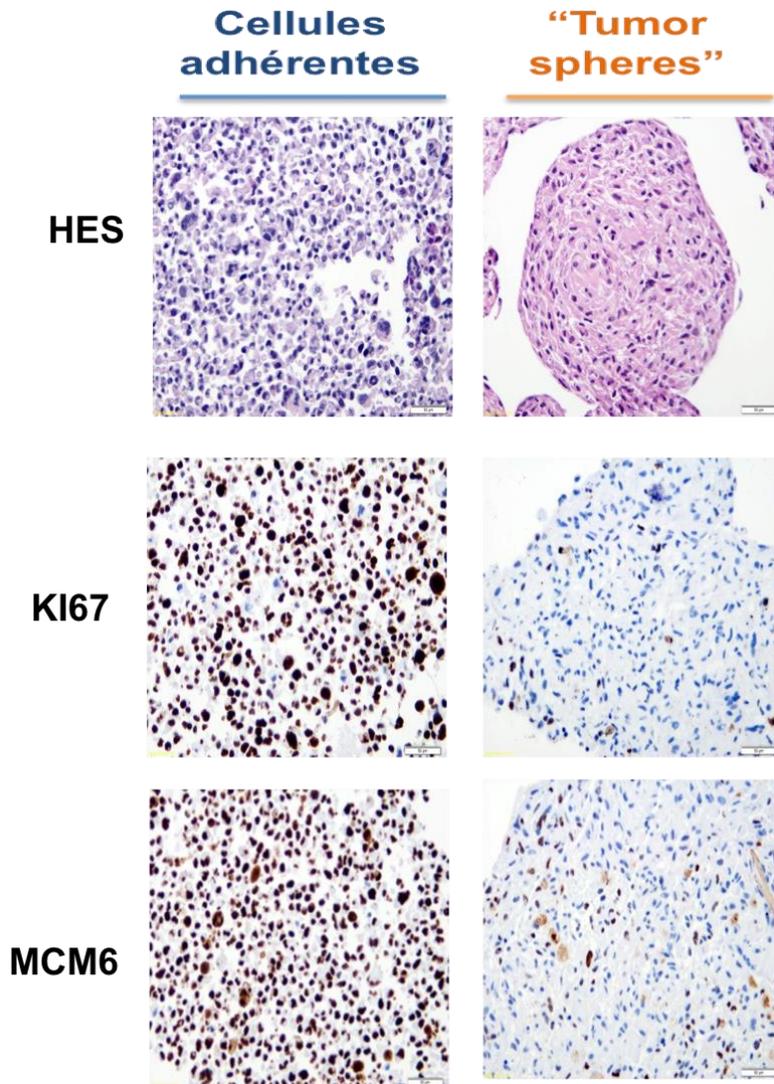


Figure 30 : Les marqueurs de prolifération KI67 et MCM6 sont sous-exprimés dans les tumor spheres.

L'immunocytochimie a été réalisée après fixation des cellules par la formaline et après intégration dans la paraffine, en utilisant des anticorps dirigés contre KI67 et MCM6.

L'aspect morphologique des cellules est révélé par une coloration hématoxyline-eosine (HES).

Afin de démontrer que les « tumor spheres » sont des cellules pluripotentes, leur capacité de différenciation in vitro a été testée en les cultivant dans des conditions adhérentes dans un milieu contenant 1% de sérum de veau fœtal et en les marquant

avec NeuN (neurones), GFAP (astrocytes) , et Olig2 (oligodendrocytes). Les « tumor spheres » ont été capables de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Figure 31).

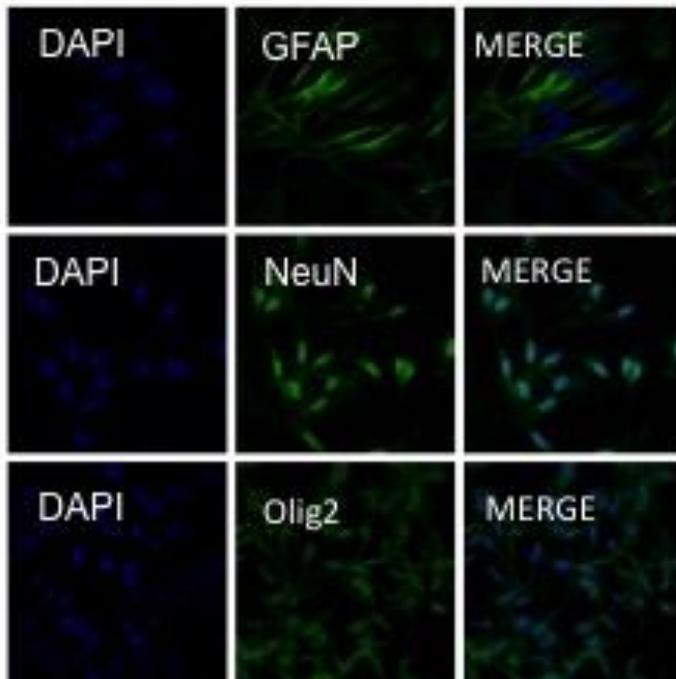


Figure 31: les « tumor spheres » sont des cellules pluripotentes pouvant se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes.

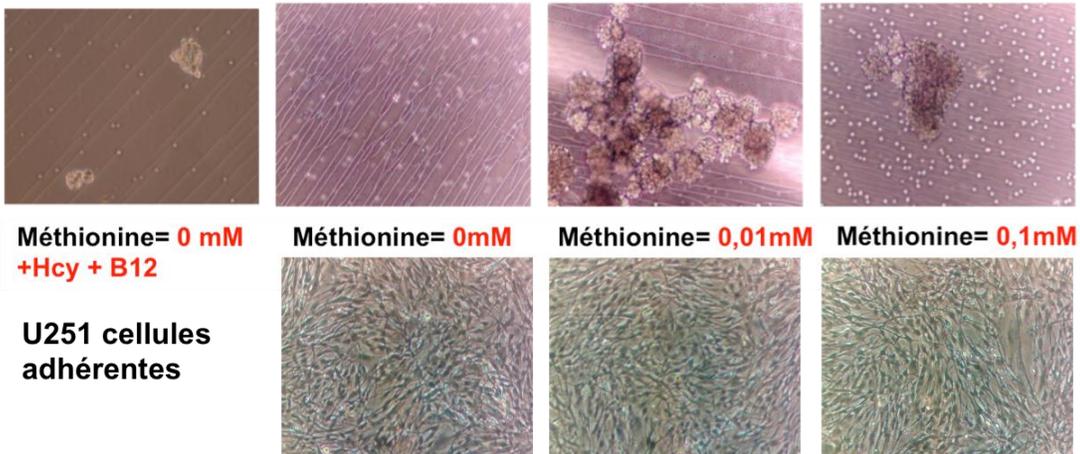
Des monoclonales « tumor spheres » ont été cultivés dans des conditions de culture spécifique autorisant la différenciation cellulaire (conditions adhérentes avec 1% de SVF). Les cellules ont été incubées avec des anticorps anti-GFAP (astrocytes), anti-NeuN (neurones) ou anti-Olig2 (Oligodendrocytes) couplés à l’Alexa 488 (vert) et avec DAPI (bleu) marquant le noyau. Les clones cellulaires se sont différenciés en astrocytes, en neurones ou bien en olidendrocytes.

2. Les tumor spheres sont méthionine dépendantes jusqu'à une certaine concentration au-delà de laquelle la méthionine ralentit la croissance

Pour tester la méthionine dépendance des « tumor spheres » et des cellules adhérentes, des milieux spécifiques ont été utilisés. Les « tumor spheres » ont été cultivées dans un milieu DMEM No methionine High Glucose No Glutamine No Cystine (Annexe 3) + B27/FGF/EGF + Pen Str 1% + cysteine 30 mg/L, sans SVF. Dans ce milieu, les concentrations mesurées de vitamine B12 et folates sont les suivantes: B12= 8 pM et Folates= 6.6 μ M. Les cellules adhérentes ont été cultivées dans un milieu DMEM No methionine High Glucose No Glutamine No Cystine + Pen Str 1% + cysteine 30 mg/L + 10% SVF. Dans ce milieu, les concentrations mesurées sont : B12= 48 pM, Folates= 6.6 μ M et méthionine= 0.02 mM. La méthionine provient de l'addition de Serum de Veau Foetal.

Contrairement aux cellules adhérentes, les « tumor spheres » sont méthionine dépendantes c'est à dire qu'elles ne se forment pas si elles sont cultivées dans un milieu sans méthionine mais contenant de l'homocystéine et de la vitamine B12 (Figure 32). L'addition de méthionine dans le milieu de culture, à une concentration = 0.01 mM, stimule la formation des « tumor spheres » par un facteur 34, alors que la multiplication des cellules adhérentes monocouche est modérément stimulée (X2) (Figure 32). Il faut noter que le milieu utilisé pour la culture des « cellules adhérentes » contient déjà 0.02 mM de méthionine avant toute addition de méthionine exogène. Le milieu utilisé pour la culture des « tumor spheres » ne contient pas de méthionine au départ. La concentration de méthionine dans les puits où sont cultivées les « tumor spheres » provient uniquement de la méthionine exogène rajoutée dans le milieu.

U251 “Tumor spheres”



Méthionine= 0 mM
+Hcy + B12

Méthionine= 0mM

Méthionine= 0,01mM

Méthionine= 0,1mM

U251 cellules
adhérentes

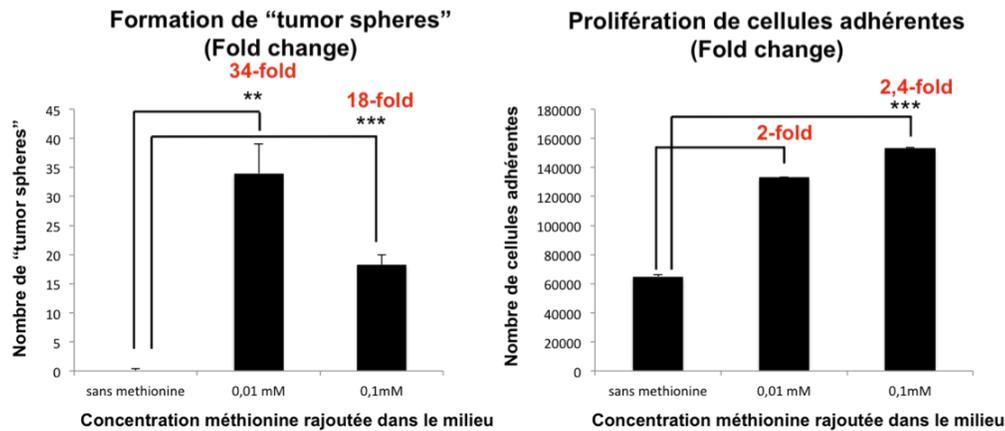


Figure 32: Les « tumor spheres » sont beaucoup plus méthionine dépendantes que les monolayers.

Les “tumors spheres” U251 ne se forment pas dans un milieu sans méthionine supplémenté en Homocystéine (0.02mM) et vitamine B12 (0.02mM). La formation des “tumors spheres” dépend beaucoup plus de l’addition de méthionine exogène que la prolifération des cellules adhérentes. Il faut noter qu’avant l’addition de méthionine exogène, le milieu de culture des cellules adhérentes contient déjà 0.02 mM de méthionine. En augmentant la quantité de méthionine exogène, le nombre de « tumor spheres » est multiplié par un facteur 34 et 18 pour 0.01 et 0.1 mM de méthionine respectivement, alors que le nombre des « cellules adhérentes » est multiplié par un facteur 2 et 2,4 respectivement. Composition du milieu de culture des « tumor spheres » : DMEM No methionine High Glucose No Glutamine No Cystine + B27/FGF/EGF + Pen Str

*1% + cysteine 30 mg/L , sans SVF, avec les concentrations finales mesurées B12= 8 pM et Folates= 6.6 μ M. Composition du milieu de culture des cellules adhérentes : DMEM No methionine High Glucose No Glutamine No Cystine + Pen Str 1% + cysteine 30 mg/L + 10% SVF avec les concentrations finales mesurées B12= 48 mM, Folates= 6.6 μ M et méthionine= 0.02 mM. ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.*

En fait, la croissance des « tumor spheres » en présence de méthionine décrit une courbe en cloche, ce qui signifie qu'elle est ralentie si la concentration en méthionine s'élève au-dessus de 0.01mM (Figure 33). Ceci indique que l'homéostasie de la méthionine est essentielle afin que les tumor spheres se forment de façon optimale.

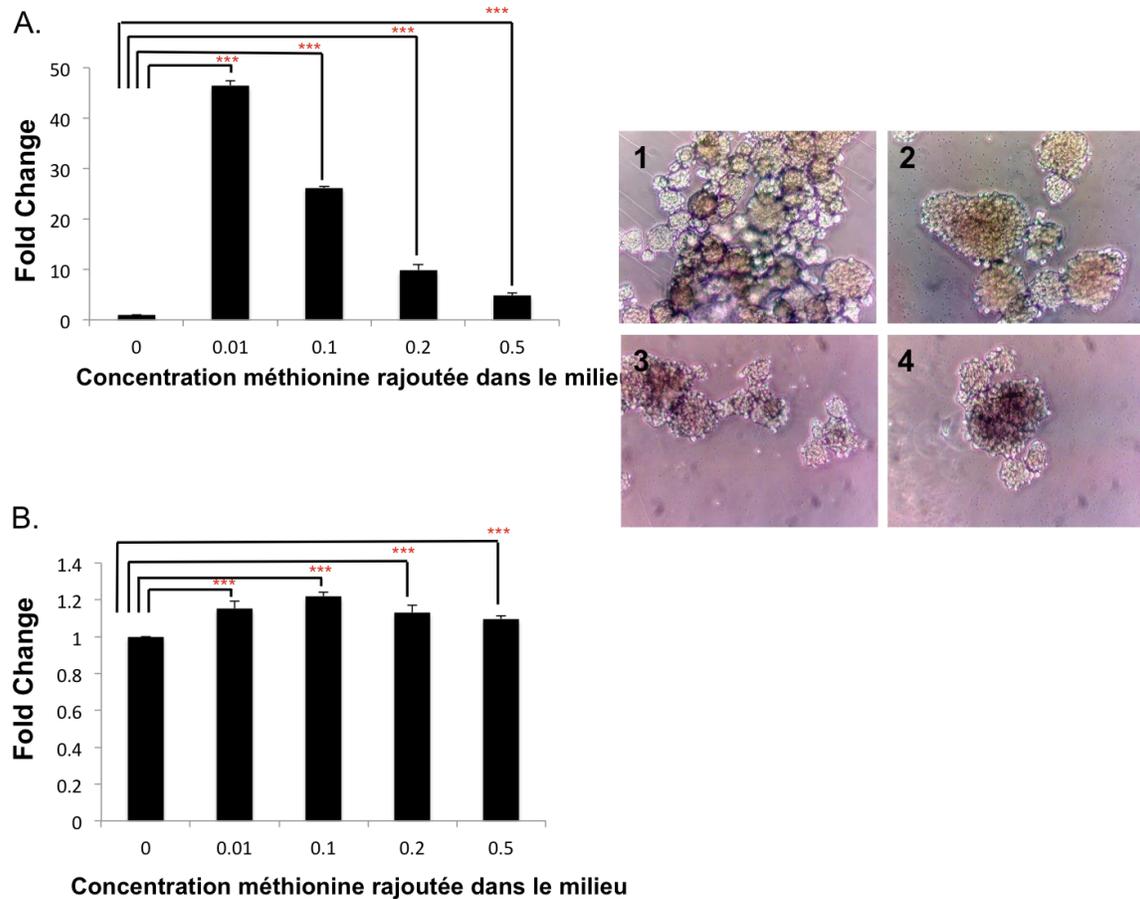


Figure 33: Une concentration de méthionine rajoutée dans le milieu de culture, supérieure à 0.01 mM, réduit la croissance des « tumor spheres » sans que ce phénomène de ralentissement ne soit observé sur les cellules adhérentes.

A. La courbe dose/réponse ou formation des “tumor spheres” en fonction de la concentration de méthionine décrit une allure en cloche. La concentration optimale de méthionine rajoutée dans le milieu de culture est égale à 0.01 mM, ensuite la formation de “tumor spheres” décroît entre 0.1 et 0.5 mM ; B. La croissance des cellules adhérentes est stimulée quand la concentration de méthionine rajoutée dans le milieu de culture est égale à 0.01 mM et reste presque constante entre 0.01 et 0.5 mM. Photos 1, 2, 3 et 4 : Aspect des « tumor spheres » avec des concentrations de méthionine rajoutée dans le milieu de culture égales à 0,01 - 0,1 - 0.2 et 0.5 mM, respectivement. Il faut noter que le milieu de culture des « tumor spheres » ne contient pas de méthionine au départ alors que celui des cellules adhérentes contient méthionine = 0.02mM. Les

*concentrations de méthionine indiquées sur le graphe correspondent aux quantités de méthionine rajoutées dans les 2 milieux de culture. ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.*

3. Profils transcriptomiques des « tumor spheres » et des cellules adhérentes par séquençage des ARNs

Les résultats précédents ont permis de mettre en évidence que les phénotypes des « tumor spheres » et des cellules adhérentes sont différents et que les « tumor spheres » ont une méthionine dépendance prononcée non retrouvée dans les cellules adhérentes. Nous avons eu recours séquençage haut débit par RNA-Seq (ou RNA sequencing) pour identifier les programmes transcriptionnels spécifiques qui pourraient aider à expliquer les différences phénotypiques entre les 2 types de cellules.

3.1. Transcriptomes : description générale

La classification hiérarchique des 23 048 gènes exprimés dans les transcriptomes des cellules U251 cellules adhérentes et des U251 « tumor spheres » révèle la présence de 3 clusters délimitant des profils d'expression différentielle significative, ce qui représente une dérégulation de plus du tiers du transcriptome. Les annotations fonctionnelles révèlent l'existence dans les « tumor spheres » d'une répression intensive du cycle cellulaire et des mécanismes associés, ainsi que l'existence d'une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans le système GTP/GDP binding et dans plusieurs processus cellulaires comme la gliogenèse, le chimiotactisme neural, la matrice extracellulaire, le métabolisme des stéroïdes et des acides gras et la transduction du signal (Figure 34).

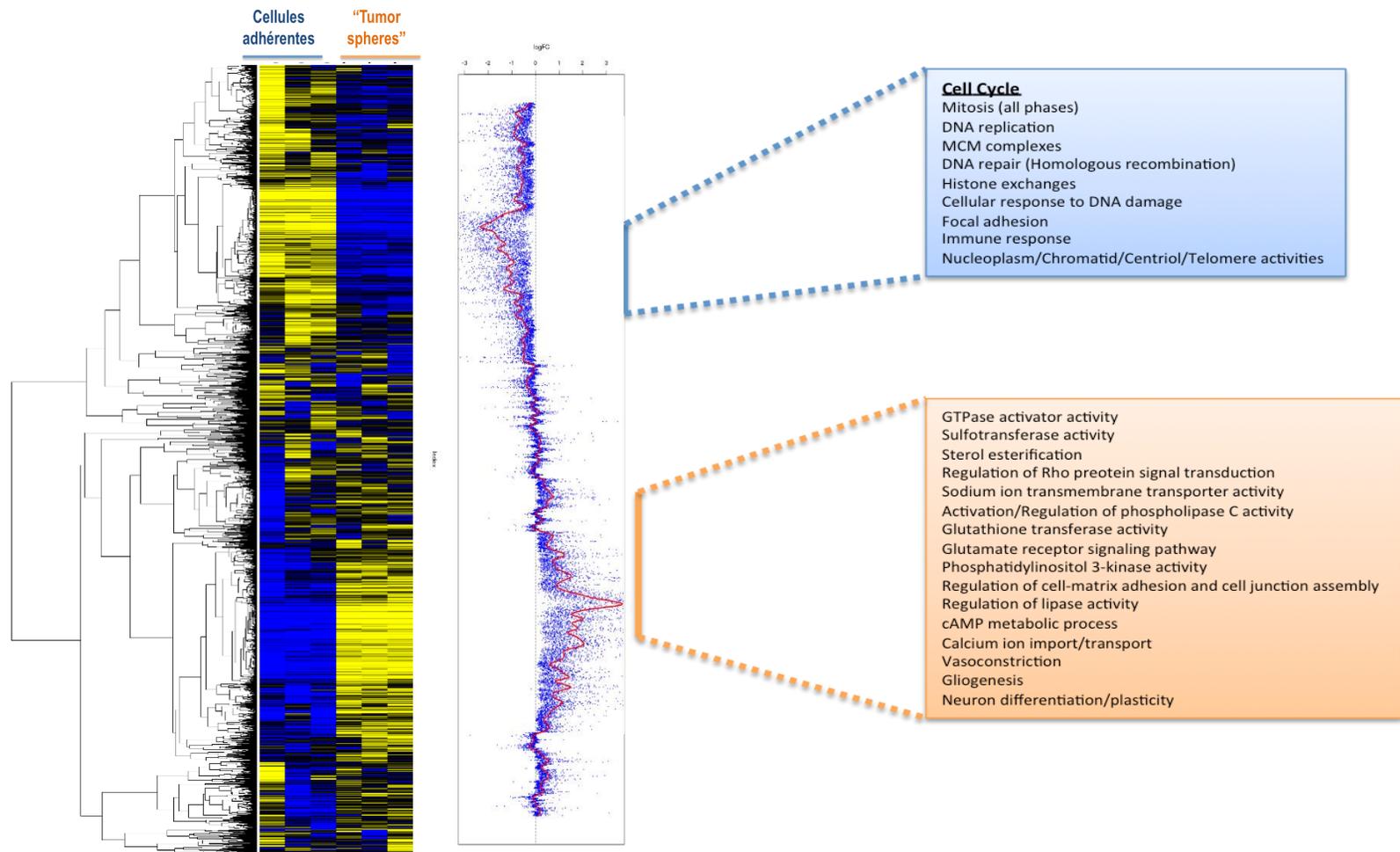
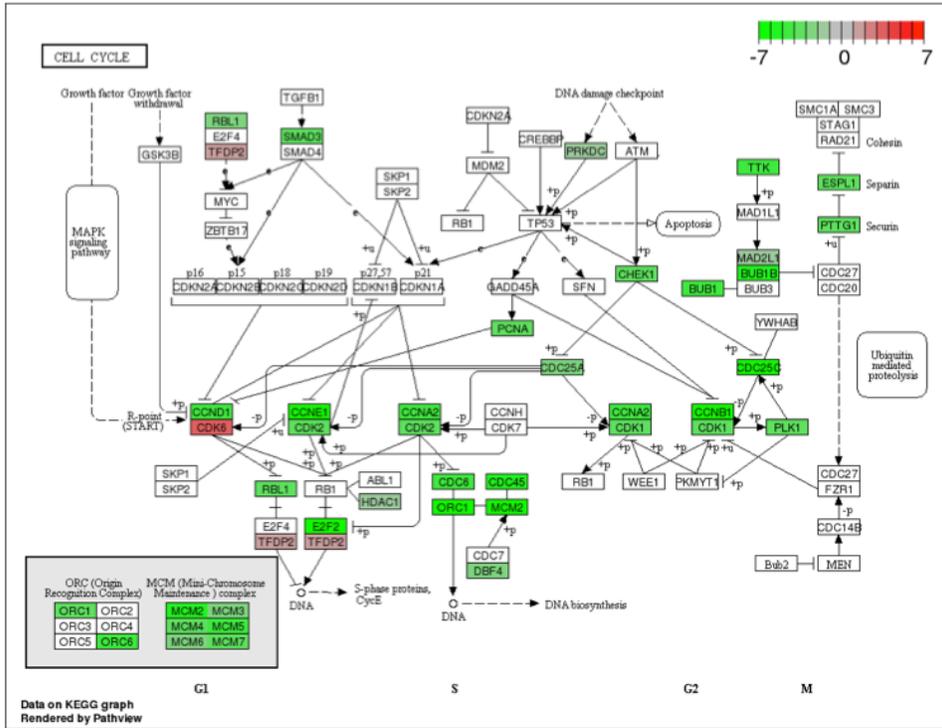


Figure 34: les annotations fonctionnelles des principaux clusters exprimés de façon différente entre les « tumor spheres » et les cellules adhérentes

La classification hiérarchique des 23 048 gènes exprimés dans les transcriptomes des cellules adhérentes et des « tumor spheres » révèle la présence de 3 clusters délimitant des profils d'expressions différents avec plus du tiers du transcriptome qui varie. Les annotations fonctionnelles correspondantes montrent une répression significative du cycle cellulaire et des mécanismes associés, ainsi qu'une surexpression de certains gènes impliqués dans le système GTP/GDP binding et dans plusieurs processus cellulaires comme la gliogenèse, le chimiotactisme neural, la matrice extracellulaire, le métabolisme des stéroïdes et des acides gras et la transduction du signal. FC > 1 : jaune, sur-exprimé ; FC < 1 : bleu, sous-exprimé

3.2. Le cycle cellulaire

Les gènes impliqués dans le cycle cellulaire sont sous-exprimés dans les « tumor spheres » et incluent notamment les voies métaboliques ou fonctions cellulaires suivantes, selon les voies décrites dans KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Figure 35) : la réplication de l'ADN, le système de réparation des mésappariements (mismatches), le système « Base Excision Repair », la recombinaison homologue et les systèmes du spliceosome et protéasome. Les gènes impliqués dans la réplication de l'ADN sous-exprimés dans les « tumor spheres » comprennent entre autres : E2F2, qui code un facteur de transcription jouant un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire et la suppression de tumeurs ; SMAD3, qui code une protéine impliquée dans la signalisation associée à la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose ; les complexes MCM et THO avec notamment les gènes MCM, PCNA et CDC20, impliqués dans la réplication de l'ADN ; les ADN polymérases comme POLA1, POLA2 et les hélicases, mais aussi les cyclines A, D et E, et les cyclines kinases CDK1, CDK2, CDC25A, et CDC25C (Figure 35).



Cell cycle pathway

Replication complex (Eukaryotes)

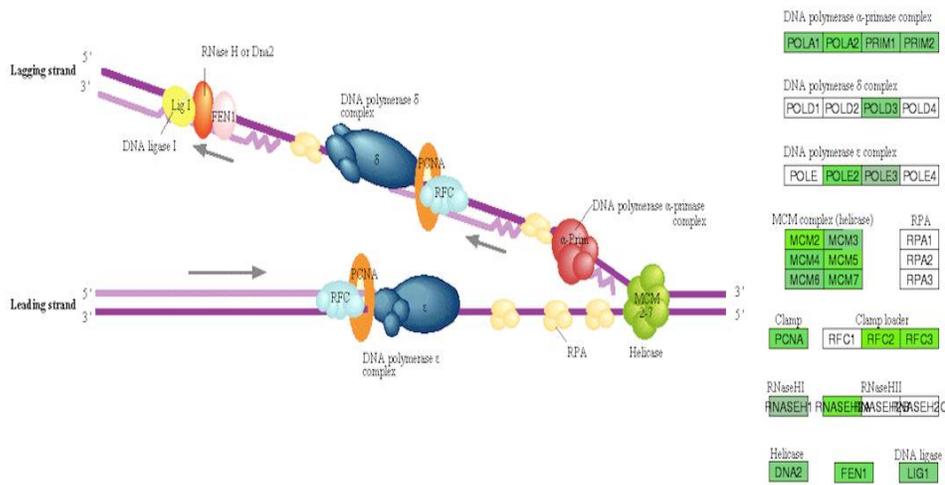


Figure 35: le cycle cellulaire est inhibé dans les cellules U251 « tumor spheres » comparativement aux cellules U251 adhérentes.

Les principaux gènes (selon la représentation dans KEGG) sous-exprimés (colorés en vert) dans les « tumor spheres » incluent: CDC6, E2F2, le complexe MCM notamment MCM2 à MCM6, les ADN polymerases comme POLA1, POLA2...

3.3. Les histones

Les histones sont codées par des gènes organisés en clusters de taille variable localisés sur certains chromosomes, notamment le 1 et le 6. La famille des gènes des histones est dominée par 2 grands clusters qui se trouvent sur le chromosome 6 mais elle possède aussi des gènes dispersés sur d'autres chromosomes. Chaque cluster peut contenir les gènes des 5 protéines histones et chaque gène est répété un certain nombre de fois. Cette organisation en batterie permet de synthétiser de grandes quantités de chaque protéine histone pendant la phase S, afin d'empaqueter rapidement l'ADN nouvellement synthétisé. Par exemple, la plupart des gènes de l'histone H4 synthétisée pendant la réplication, mais aussi des gènes codant d'autres histones, sont situés dans le cluster histone-1 (HIST1) sur le chromosome 6p22-p21. Deux autres clusters des gènes d'histones, HIST2 et HIST3, sont localisés sur les chromosomes 1q21 et 1q42, respectivement. HIST2 contient 1 gène qui code H4 pendant la réplication, HIST2H4A, mais il n'y a pas de gènes H4 dans HIST3. Un gène H4 supplémentaire, HIST4H4, se trouve sur le chromosome 12p13.1

La classification hiérarchique de l'ensemble des gènes codant les histones a révélé que deux clusters génomiques principaux qui codent les histones sont sous-exprimés dans leur totalité dans les « tumor spheres » (Figure 36) : le cluster HIST1 qui code les 5 types d'histones H1, H2A, H2B, H3 et H4 et le cluster HIST2 qui code les histones H2A, H2B et H3. Curieusement, chaque cluster contient un « long intergenic non coding RNA (lincRNA) » sur-exprimé : linc00240 dans le cluster HIST1 sur le chromosome 6, fold change= 2.31 (Figure 37) et linc00869 dans le cluster HIST2 sur le chromosome 1, fold change= 2.29 (Figure 38). Les lincRNA sont des gènes transcrits et non traduits qui interviennent dans de nombreux mécanismes de régulation des gènes. Des travaux de plus en plus nombreux suggèrent qu'ils contribuent à contrôler la différenciation cellulaire et à maintenir l'identité de la cellule (Guttman *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013). En identifiant les lincRNA présentant une expression différente entre les « tumor spheres » et les cellules adhérentes, nous avons également étudié leurs positions chromosomiques et nous avons ainsi répertorié les régions génomiques qui contiennent

un lincRNA à proximité d'un ensemble de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et présentant des variations opposées (Figure 39). Toutes les régions répertoriées contiennent un lincRNA sur-exprimé situé à proximité d'un ensemble de gènes sous-exprimés, sauf une seule (dans laquelle le lincRNA est sous-exprimé). L'hypothèse qui a guidé ce regroupement par position est la suivante : le lincRNA pourrait être responsable de la sous-expression d'un ensemble de gènes localisé dans la même région génomique. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

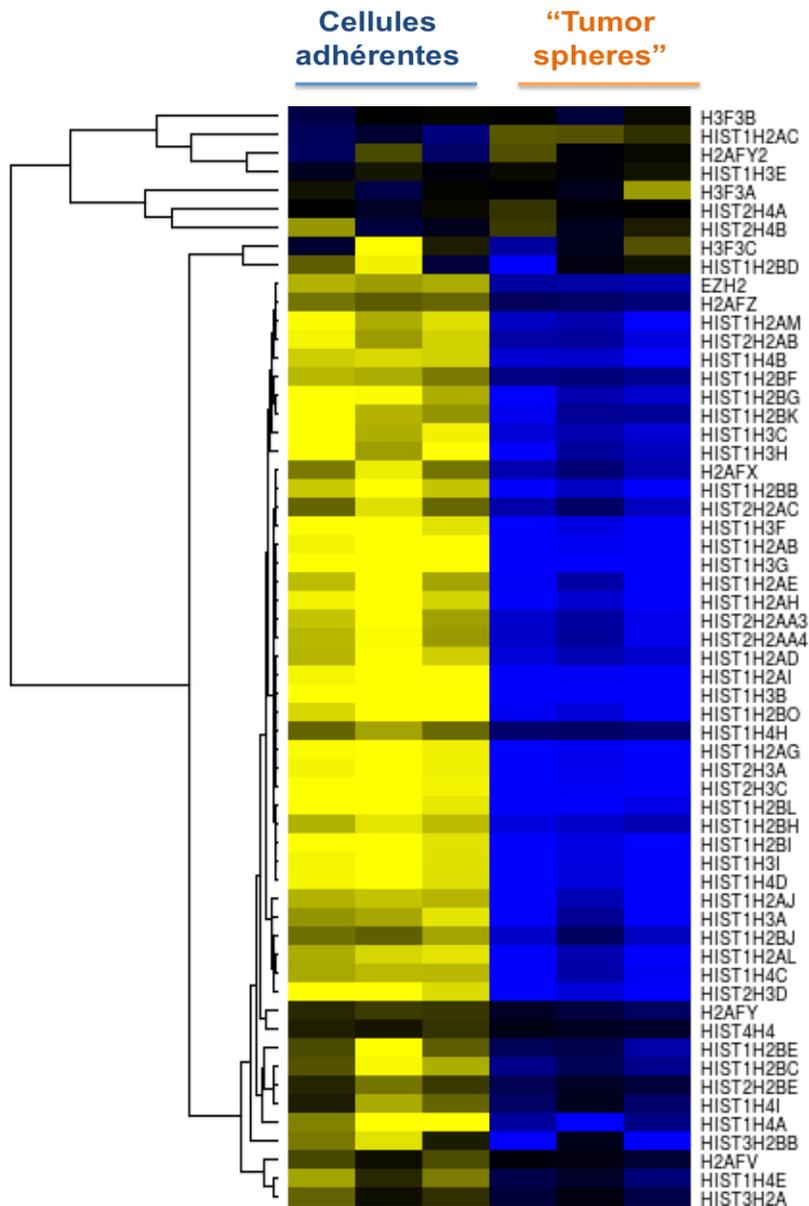


Figure 36: « heatmap » des gènes codants les histones

Les gènes des histones sont groupés en clusters sur le génome et chacun d'entre eux contient des gènes qui codent toutes les histones (H1, H2A, H2B, H3 and H4). La classification hiérarchique a révélé que les deux clusters génomiques HIST1 et HIST2 sont sous-exprimés dans les « tumor spheres ».

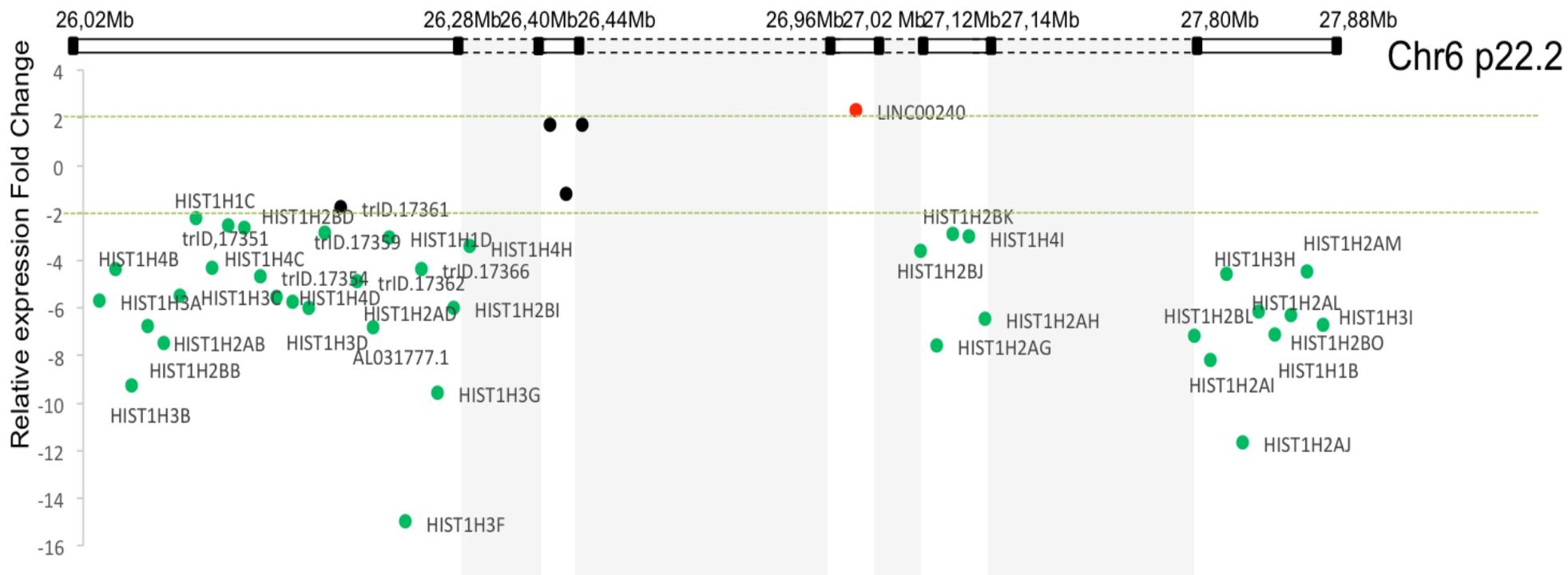


Figure 37 : Expression et position de linc00240 et des gènes codant les histones du cluster HIST1

Linc00240 est sur-exprimé dans les U251 « tumor spheres » comparativement aux cellules U251 adhérentes monocouche. Il est localisé sur le chromosome 6 dans une région qui contient un cluster de gènes codant les histones, tous sous-exprimés de façon significative.

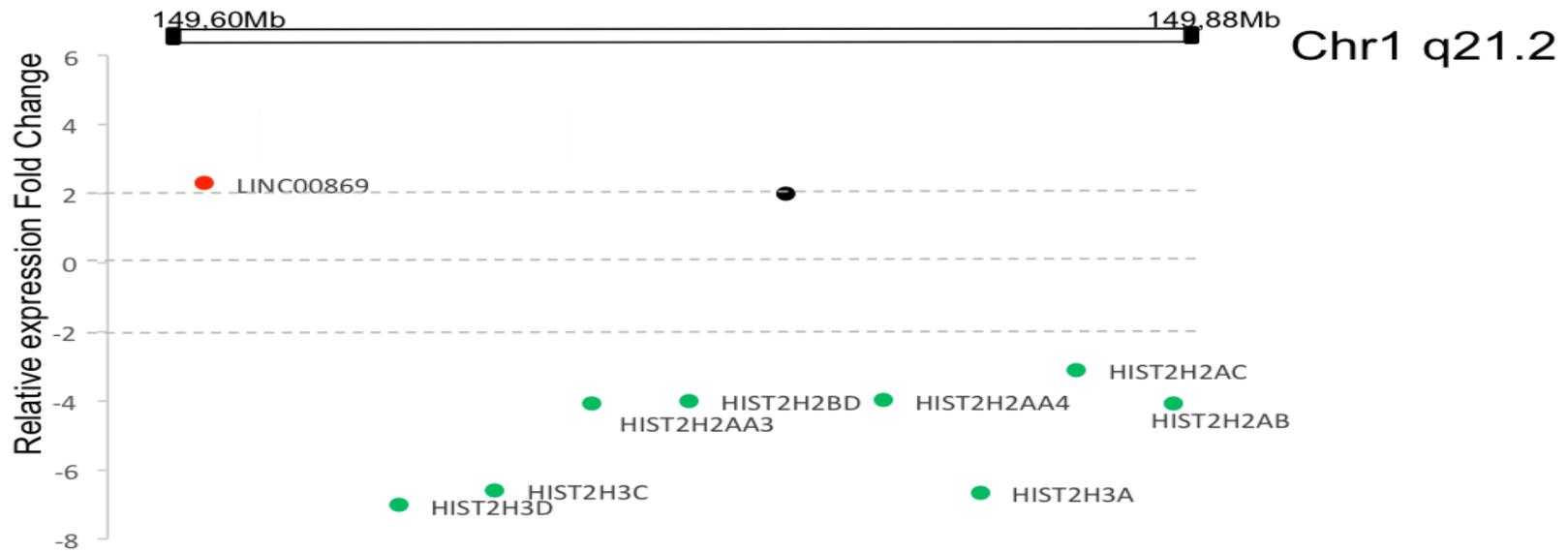


Figure 38 Expression et position du Lin00869 et des gènes codant les histones dans le cluster HIST2

Linc00869 est sur-exprimé dans les « tumor spheres » par rapport aux cellules adhérentes et la région chromosomique où il se situe contient des gènes d'histones sous-exprimés.

Gene ID	Fold change	P-value	Chr	Start	End	Strand	Cell cycle genes / whole regions	Affected region length	Notes
<i>LINC00623</i> // <i>ENSG00000226067</i>	3.683	0.000278704059260888	1	120913275	120953463	+	<i>HIST2H3DP1, HIST2H2BA, PHGDH</i>	-	suspected duplicated region from HIST2 region on chromosome 1
<i>LINC01152</i> // <i>ENSG00000256124</i>	1.83	0.000477568857894697	17	72030654	72041297	+	<i>NUP85, ST6GALNAC2</i>	-	
<i>LINC00869</i> // <i>ENSG00000277147</i>	2.299	0.000544196340304146	1	149607307	149647610	+	<i>HIST2H2BE, HIST2H3D, HIST2H4A, HIST2H3C, HIST2H2AA3, HIST2H2BD, HIST2H2B C, HIST2H2AA4, HIST2H3A, HIST2H4B, HIST2H2AC, HIST2H2AB, HIST2H2BB</i>	300 kb downregulated	all HIST2 genes are downregulated. Possibly clustered.
<i>LINC00950</i> // <i>ENSG00000281205</i>	2.185	0.000756416969579681	9	35858738	35865518	+	<i>MELK, POLR1E, FANGC</i>	-	
<i>LINC00641</i> // <i>ENSG00000258441</i>	2.046	0.00108669913122134	14	21200079	21205503	-	<i>HAUS4, AJUBA, PCK2, PSME1, PSME2</i>	-	
<i>LINC00893</i> // <i>ENSG00000241769</i>	2.938	0.0016683307732439	X	149533916	149534428	-	<i>RAB39B, RAB28P5, STK26, CUL4B</i>	-	
<i>LINC00936</i> // <i>ENSG00000271614</i>	3.699	0.00182328109244036	12	89708959	89712590	+	<i>NEDD1, PPP1R12A, E2F7, NUDT4</i>	-	
<i>LINC01125</i> // <i>ENSG00000228486</i>	4.242	0.00257018665293015	2	97669746	97703056	+	<i>CNOT11, BUB1, NCAPH, ATOH8</i>	-	
<i>LINC01296</i> // <i>ENSG00000244306</i>	3.201	0.00483011200797235	14	19295306	19295921	-	<i>HAUS4, AJUBA, PCK2, PSME1, PSME2</i>	-	
<i>LINC00327</i> // <i>ENSG00000232977</i>	3.049	0.00698345684788909	13	23466571	23470642	+	<i>SKA3, LATS2, CDK8, BRCA2, RPSAP54, RPS7P10</i>	-	
<i>LINC00488</i> // <i>ENSG00000214381</i>	3.301	0.0094405807928209	3	109178165	109185257	+	<i>GTPBP8, NAA50, POLQ, PARP9</i>	-	
<i>LINC00240</i> // <i>ENSG00000224843</i>	2.314	0.00962492552172908	6	26956992	26974367	+	<i>HIST1H2BJ, HIST1H2AG, HIST1H4I, HIST1H2AH, HIST1H2BL, HIST1H2AI, HIST1H3H, HIST1H2AJ, HIST1H2BN, HIST1H2AL, HIST1H1B, HIST1H3I, HIST1H2AM, HIST1H2B O, HIST1H4H, HIST1H2BI, HIST1H3G, HIST1H3F, HIST1H1D, HIST1H2AD, HIST1H3D, HIST1H4D, HIST1H2BD, HIST1H2BC, HIST1H4C, HIST1H1C, HIST1H3C, HIST1H2BB, HIST1H2AB, HIST1H3B, HIST1H4B, HIST1H3A</i>	1.9 Mb downregulated	all HIST1 genes are downregulated. Possibly clustered.
<i>LINC01024</i> // <i>ENSG00000245146</i>	2.199	0.0198706301775175	5	140102922	140107643	-	<i>CDC25C, KIF20A, IRF1, H2AFY</i>	-	
<i>LINC01268</i> // <i>ENSG00000227502</i>	2.081	0.0229410297806495	6	113868013	113873351	-	<i>ROS1, TPD52L1, TUBE1, CEP57L1</i>	-	
<i>LINC00888</i> // <i>ENSG00000240024</i>	1.791	0.0250256232030376	3	183447591	183456008	+	<i>RPSAP31, PSMD2, SOX2, ECT2</i>	-	
<i>LINC00643</i> // <i>ENSG00000186369</i>	7.447	0.0274251041140173	14	62117357	62128414	+	<i>RHOJ, HSPA2, PSMA3, DLGAP5, CDKN3, PSMC6, POLE2, RAB15, HIF1A</i>	-	
<i>RP4-665J23.1</i> // <i>ENSG00000233593</i>	2.225	0.0113744368916267	1	90829547	90836161	-	<i>GBP5, GBP2, GBP1P1, GBP4, GBP3, GBP1, LRRC8C, LRRC8D, CDC7</i>	2.52 Mb downregulated	not organized in cluster
<i>XIST</i> // <i>ENSG00000229807</i>	578.899	0.00590399935488789	X	73820656	73852753	-	<i>TSIX</i> and XIC region	600 kb upregulated	X inactivation center
<i>MIR99AHG</i> // <i>LINC00478</i> // <i>ENSG00000215386</i> // <i>MONC</i>	-10.932	2.50680375604211e-05	21	15928296	16627397	+	<i>ZNF355P, USP16, CHAF1B</i>	gene length: 540 kb in its longest size	alternative start 140kb upstream of gene annotation

Figure 39 : Dans les « tumor spheres », certains lincRNA ont une variation opposée aux autres gènes dans un même cluster génomique

Ce tableau consigne les clusters génomiques à l'intérieur desquels un lincRNA et un ensemble de gènes ont des variations opposées.

Parmi eux figurent le *linc00240* dans le cluster *HIST1* sur le chromosome 6 et le *linc00869* dans le cluster *HIST2* sur le chromosome 1.

La couleur rouge indique une surexpression et la couleur verte une sous expression

3.4. Métabolisme des nucléotides

La voie de synthèse des pyrimidines (Figure 40) est sous-exprimée dans les « tumor spheres ». Elle comprend un ensemble de gènes, notamment TK1, qui code une enzyme cytosolique catalysant l'addition du groupement phosphate à la thymidine pour donner du dTMP, ainsi que le gène RRM2, qui code 2 sous-unités d'une ribonucléotide réductase qui catalyse la formation de déoxyribonucleotides à partir de ribonucléotides.

La voie de synthèse des purines contient quant à elle un cluster de gènes sous-exprimés, incluant notamment PDE5A, qui code une phosphodiesterase spécifique de cGMP précurseur du 5'GMP impliqué dans le relâchement musculaire du système cardiovasculaire, ainsi qu'un cluster sur-exprimé comprenant notamment ADCY1, qui code une protéine de la famille des adénylates cyclases exprimées principalement dans le cerveau (Figure 41).

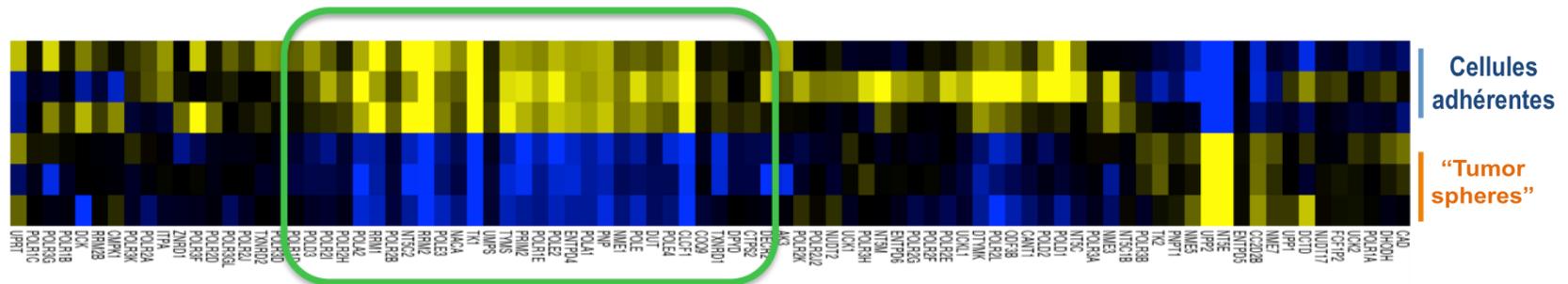


Figure 40 « heatmap » des gènes impliqués dans le métabolisme des pyrimidines

La plupart des gènes de la voie des pyrimidines sont sous-exprimés dans les « tumor spheres », notamment les gènes TK1 et RRM2.

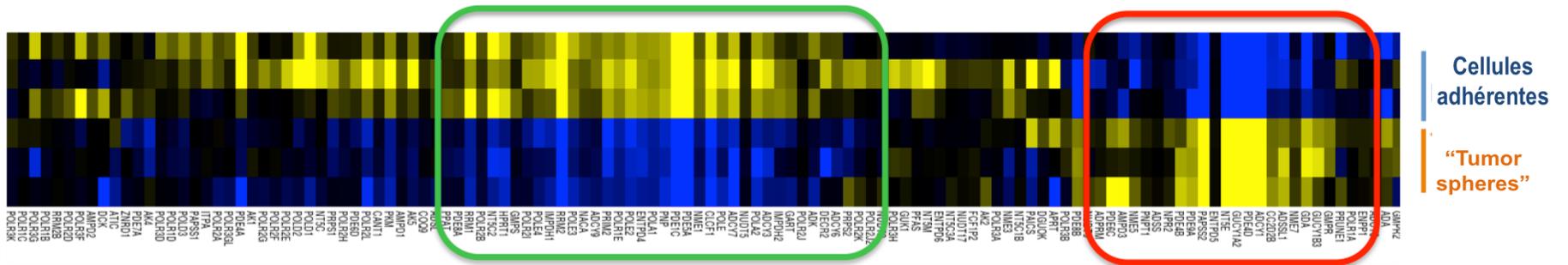


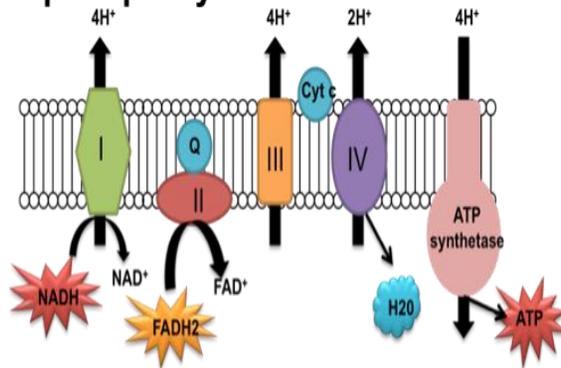
Figure 41 « heatmap » des gènes impliqués dans le métabolisme des purines

Les gènes impliqués dans la voie métabolique des purines sont altérés. Il existe un cluster de gènes sur-exprimés contenant notamment ADCY1 et NT5E et un cluster de gènes sous-exprimés contenant entre autres PDE5A et PDE1C.

3.5. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est une voie métabolique diminuée dans le transcriptome des « tumor spheres » (Figure 42). Par exemple, le gène *NDUFA11*, qui code une sous-unité du complexe 1 mitochondrial lié à la membrane, est sous-exprimé dans les « tumor spheres ». Le complexe 1 est composé de nombreuses sous-unités et fonctionne en tant que NADH-ubiquinone réductase de la chaîne de transport des électrons. De même, le gène *ATP5D* est sous-exprimé dans les « tumor spheres ». Ce gène code une sous-unité de l'ATP synthase mitochondriale, qui intervient dans la synthèse d'ATP en utilisant un gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie.

Oxidative phosphorylation



Reduced oxidative phosphorylation enzymes

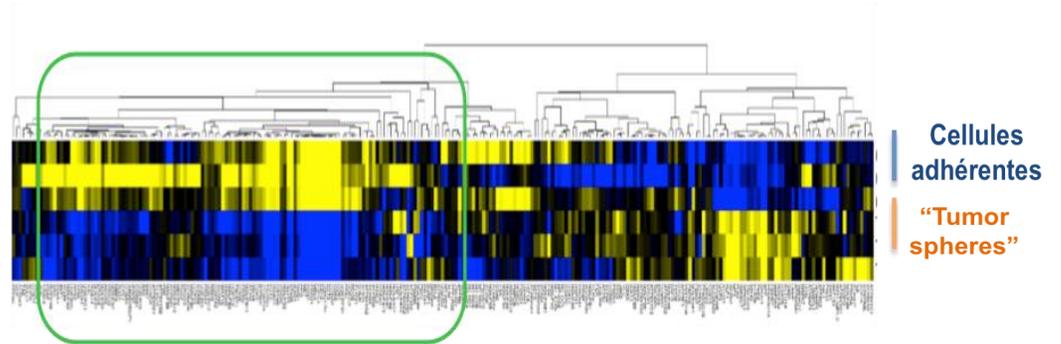


Figure 42: Représentation schématique de la voie de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie et classification hiérarchique des gènes de cette même voie.

La heatmap des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative montre un ensemble d'une cinquantaine de gènes sous-exprimés dans les « tumor spheres »

3.6. La glycolyse

Le détournement des voies du métabolisme énergétique est un mécanisme important utilisé par les cellules cancéreuses pour survivre et proliférer (Baggetto, 1992; Cairns *et al.*, 2011; Jones and Thompson, 2009). Les expressions des gènes impliqués dans la glycolyse sont également perturbées dans les « tumor spheres ». Les transcrits sur-exprimés comprennent notamment SLC2A3, codant un des transporteurs membranaire du glucose (GLUT3), ainsi que HK2 (Hexokinase), codant une enzyme qui phosphoryle le glucose en glucose 6-phosphate, PFKL (PhosphoFructoKinase Liver type) codant une enzyme qui catalyse la conversion de D-fructose 6-phosphate en D-fructose 1,6-bisphosphate, et MPC1, un gène codant un transporteur du pyruvate dans la mitochondrie. Parmi les transcrits sous-exprimés, nous observons ALDOA, codant une enzyme qui catalyse la conversion reversible du fructose-1,6-bisphosphate en glyceraldéhyde 3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate, et PDHA1 (Pyruvate Deshydrogénase), codant une enzyme qui catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-coA.

3.7. Les transporteurs ABC

Un des moyens qui favorisent la résistance des cellules souches cancéreuses au traitement chimiothérapeutique est l'expression des transporteurs ABC ou ATP Binding Cassettes (Dean, 2009). Certains gènes qui codent les transporteurs ABC sont sur-exprimés dans les « tumor spheres ». Il s'agit, notamment des gènes ABCA1 de la sous-famille ABCA qui intervient dans le transport du cholestérol et ABCC11 de la sous-famille ABCC qui participe à des processus physiologiques impliquant des acides biliaires, des stéroïdes conjugués et des nucléotides cycliques (Figure 43).

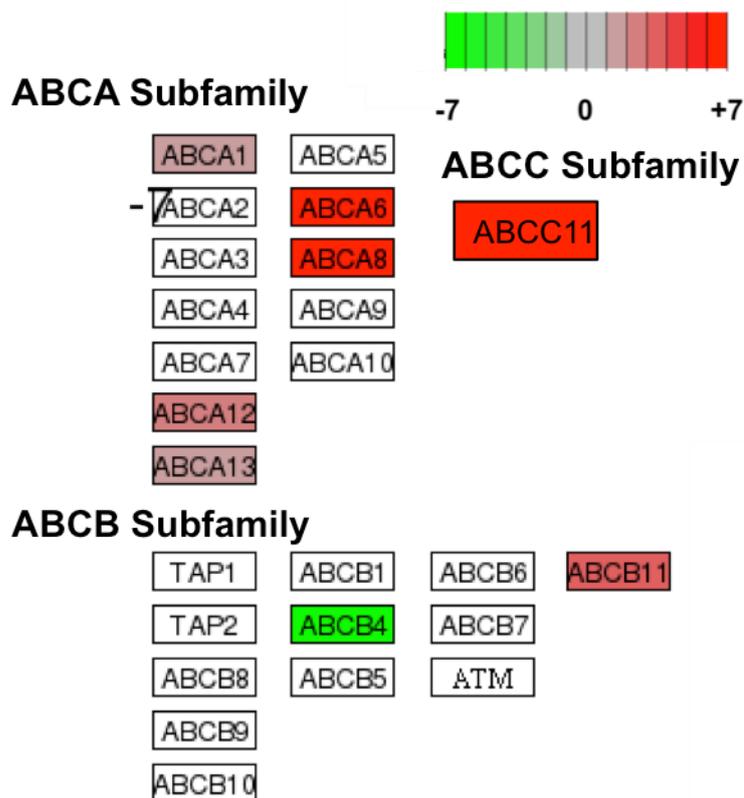


Figure 43: Les gènes des transporteurs ABC sont principalement sur-exprimés dans les « tumor spheres »

Les principaux gènes transporteurs ABC (selon la représentation dans KEGG) sur-exprimés (colorés en rouge) dans les « tumor spheres » incluent : ABCA1, ABCA6, ABCA8, ABCC11, ABCA12, ABCA13, ABCB11.

3.8. Deptor

Deptor est fortement sur-exprimé dans les « tumor spheres », avec un fold-change de 15 (Figure 44). Deptor est un inhibiteur direct de mTor. Les 2 protéines appartiennent au complexe mTorC1 qui régule la synthèse des protéines et des lipides, et le cycle cellulaire. Par conséquent, une sur-expression de Deptor entraîne une inhibition accrue de mTor et de mTorC1, entraînant par là même une diminution de la synthèse des protéines et une altération du cycle cellulaire. Ce qui pourrait expliquer, au moins en partie, la large sous-expression des gènes du cycle cellulaire observée sur le transcriptome des « tumor spheres » par rapport aux cellules adhérentes.

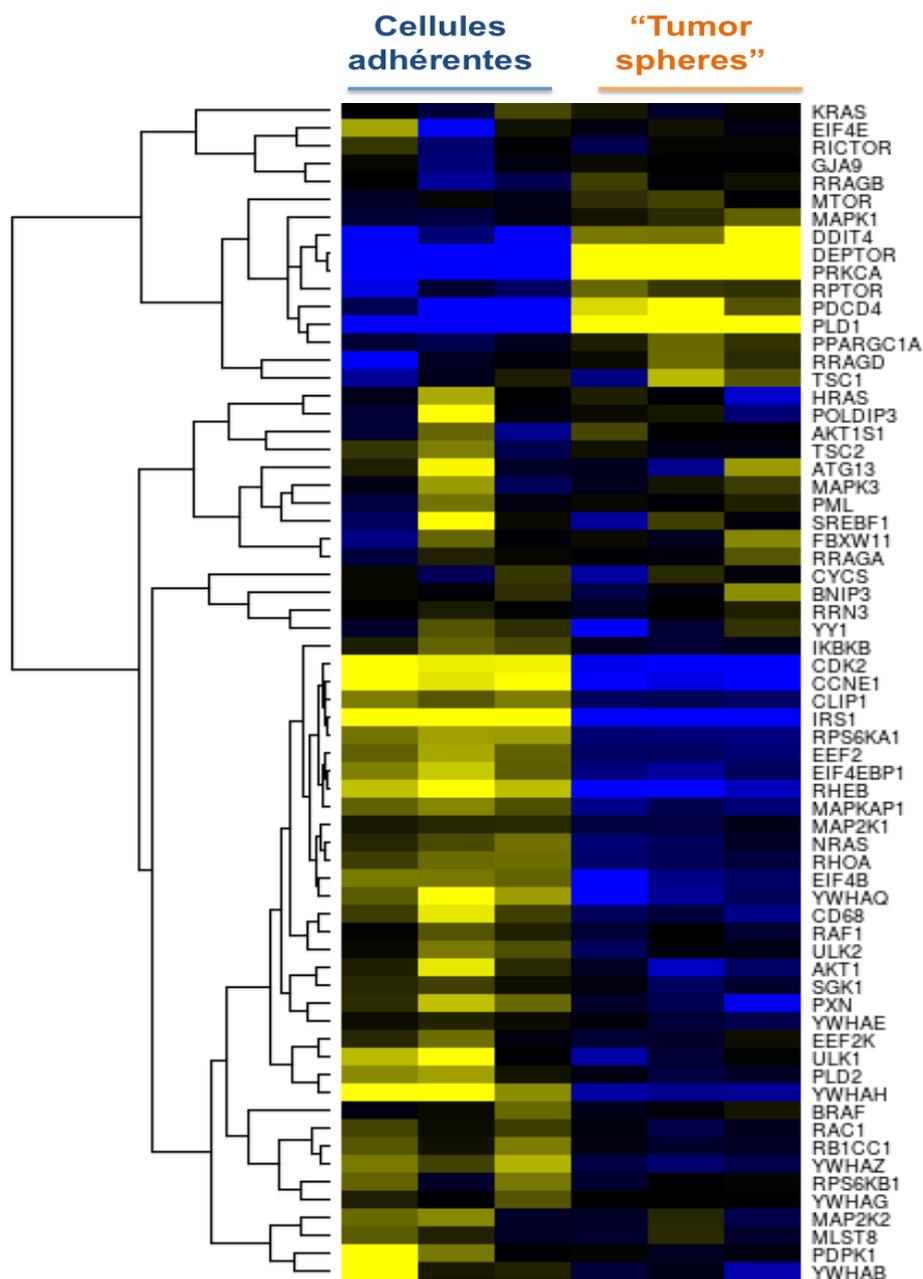


Figure 44 Deptor, un inhibiteur de mTor est sur-exprimé dans les « tumor spheres »

Deptor, inhibiteur de mTor, est sur-exprimé 15 fois dans les « tumor spheres ». Or, le complexe mTORC1, qui contient Deptor et mTor, facilite notamment la synthèse des protéines en phosphorylant la kinase S6K, et en favorisant la fixation des facteurs d'initiation de la traduction (EIF-4E) à l'extrémité 5' des ARNm. En inhibant mTOR, Deptor entraîne une diminution de la synthèse des protéines et par la suite une perturbation du cycle cellulaire.

3.9. La signature « neural stemness » des cellules souches cancéreuses

La classification hiérarchique a permis d'établir une signature « neural stemness » dans les glioblastomes (Figure 45) comportant une liste de gènes sélectionnés selon la procédure suivante : les gènes de pluripotence ayant des « fold-changes » élevés dans les « tumor spheres » ont été fusionnés avec les gènes de pluripotence décrits dans la littérature (Mathieu *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014) puis compilés avec les gènes impliqués dans les voies de pluripotence et de « stemness » extraits de la banque de données de signatures moléculaires MSIGDB. Cette signature « neural stemness » comporte des gènes sur-exprimés et sous-exprimés fortement corrélés entre eux. Parmi les gènes sur-exprimés (75%), citons : BDNF qui code le facteur de croissance neurotrophique issu du cerveau (Brain Derived Neurotrophic Factor) ; CLU ou clusterin qui code une glycoprotéine protectrice de l'intégrité cellulaire associée aux phénomènes physiologiques tels que les interactions cellules-cellules, la sécrétion et le transport des lipides ; FGF10 qui code un facteur de croissance fibroblastique de type 10 ; GFAP qui code une protéine acide fibrillaire gliale filament intermédiaire présent dans certaines cellules gliales du système nerveux central comme les astrocytes ; TBX3 qui code un facteur de transcription à boîte T contrôlant l'expression de *wnt10b* et de *lef1* ; SOX2 un gène de pluripotence ; LEFTY2 qui code un facteur de croissance influençant la différenciation ; FGFR1 gène du récepteur du facteur de croissance fibroblastique de type 1 qui code l'un des sous types de la famille des récepteurs FGFR à tyrosine kinase (TK). Parmi les gènes sous-exprimés, citons : KLF4 qui code un facteur de transcription intervenant dans la différenciation cellulaire qui contrôle le cycle cellulaire pendant la transition de la phase G1 vers la phase S ; SMAD3 ou Mothers against decapentaplegic homolog 3 qui intervient dans la voie de signalisation de SMAD qui concerne les facteurs de croissance de la famille TGF β .

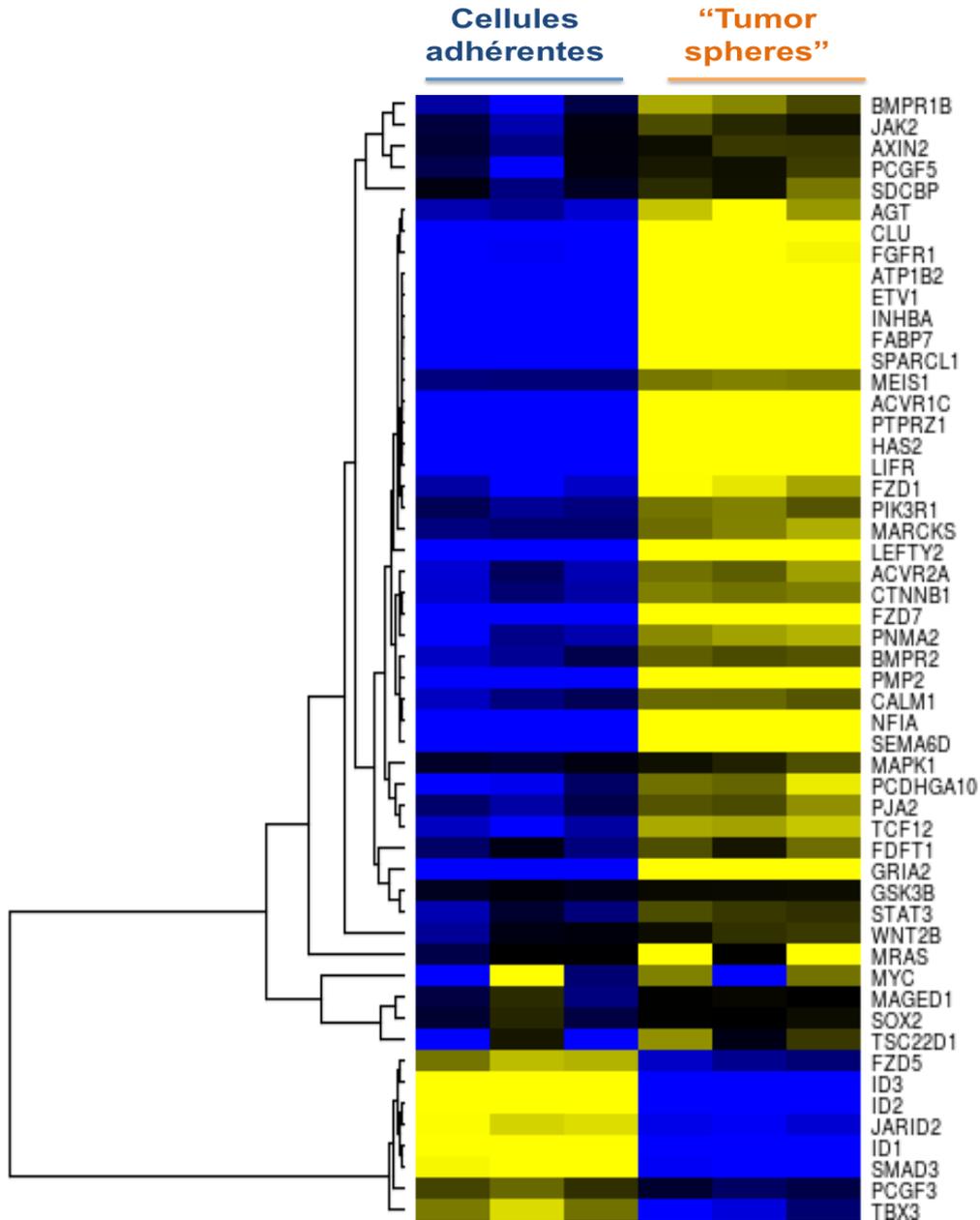


Figure 45 : Une signature « neural stemness » est identifiée dans les « tumor spheres »

La majorité (75%) des gènes impliqués dans la signature « neural stemness » sont sur-exprimés dans les tumor spheres, notamment *BDNF*, *CLU*, *FGF10*, *GFAP*, *TBX3*, *SOX2*, *LEFTY2* et *FGFR1*.

3.10. Le métabolisme des groupements monocarbonés

La « heatmap » des gènes du cycle des monocarbonés révèle une diminution de la transcription qui touche préférentiellement les gènes impliqués dans le cycle des folates

dans les « tumor spheres » (Figures 46, 47 et 48). La liste des gènes sous-exprimés comprend notamment SHMT, MTHFD1, MTHFD2 et DHFR. Les gènes impliqués dans les voies de synthèse de la méthionine (*de novo* et sauvetage) ne présentent pas de variation significative. La caractérisation du métabolisme des groupements monocarbonés revêt une importance particulière parce que celui-ci est intimement lié à la biodisponibilité de la méthionine. Nous nous sommes basés sur les résultats du transcriptome pour explorer de façon plus approfondie le rôle du cycle des folates dans la formation des « tumor spheres ». Nous avons analysé le méthylome pour déterminer si la sous-expression des gènes impliqués dans le cycle des folates est due à des modifications épigénétiques. Nous avons également réalisé des essais *in vitro* pour caractériser le fonctionnement du cycle des folates dans les « tumor spheres » et dans les cellules adhérentes monocouches. Ces résultats sont exposés plus loin dans le manuscrit.

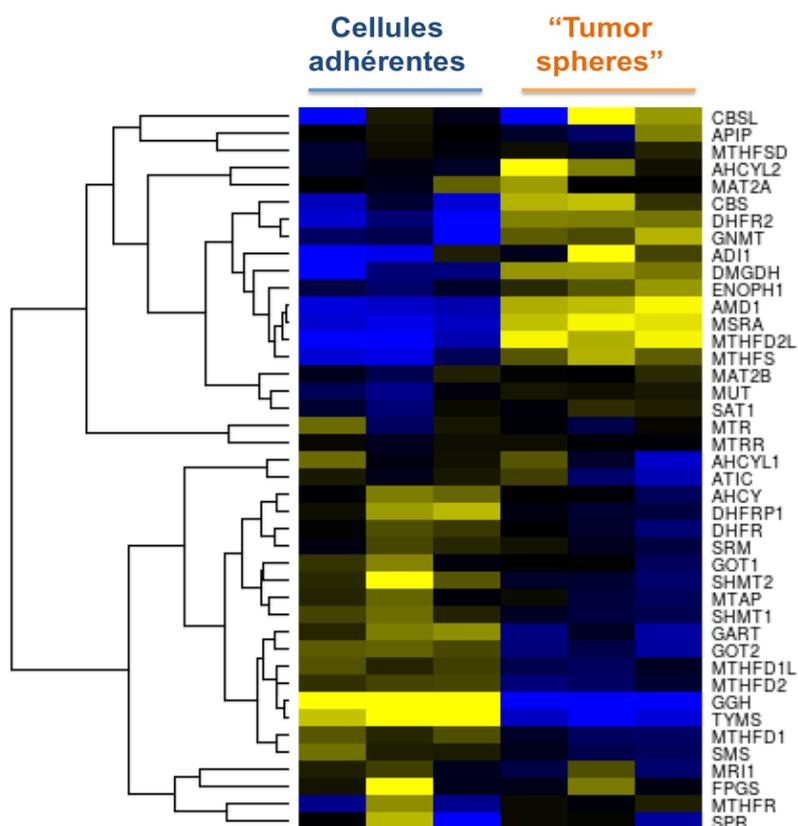


Figure 46 “heatmap” des gènes impliqués dans le cycle des monocarbonés.

Les gènes impliqués dans le cycle des monocarbonés comprennent les gènes de la voie de sauvetage de la méthionine, les gènes de la voie de synthèse *de novo*, les gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine B12 et les gènes du cycle des folates. Les gènes de la voie de sauvetage (comme GOT1, MTAP, SMS) ne varient pas entre les cellules adhérentes et les

« tumor spheres ». Par contre, les gènes impliqués dans le cycle des folates délimitent dans la classification un cluster de co-expression dont la transcription est diminuée dans les « tumor spheres ». Ce cluster contient notamment les gènes DHFR, SHMT et MTHFD.

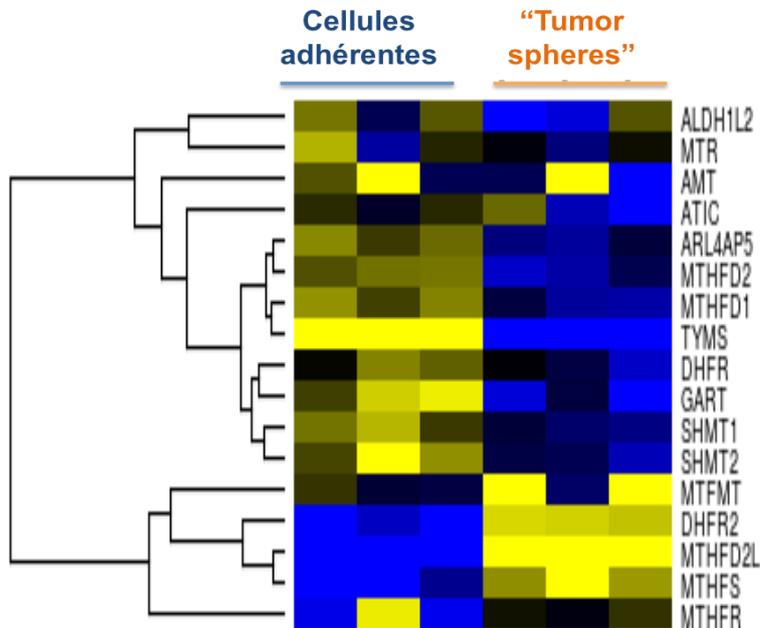


Figure 47 « heatmap » des gènes impliqués dans le cycle de folate

L'expression de la majorité des gènes impliqués dans le cycle des folates est diminuée notamment TYMS, SHMT, DHFR, MTHFD1, MTHFD2

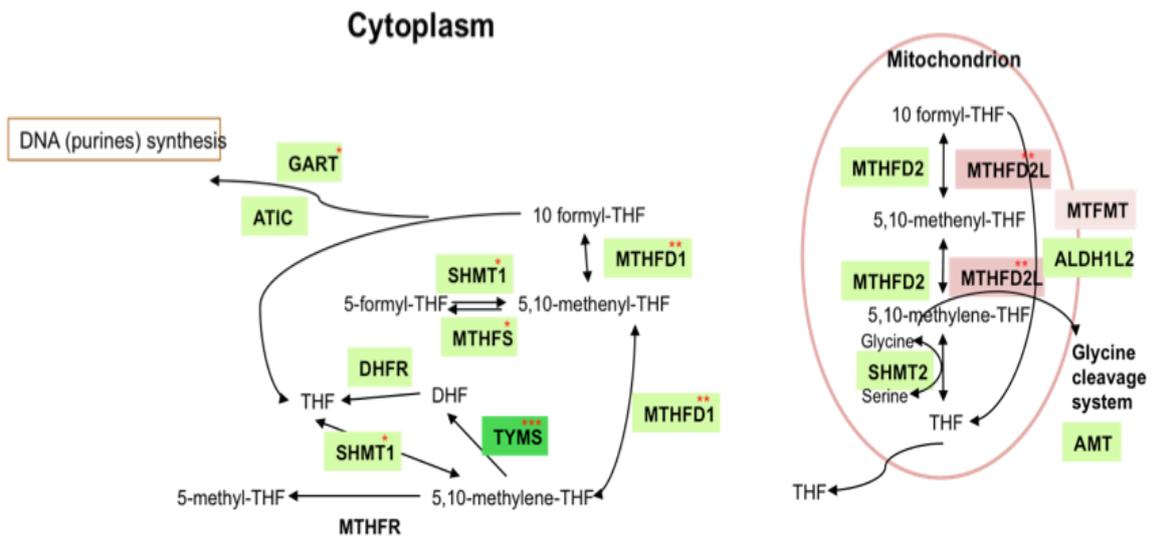


Figure 48 Les gènes impliqués dans le cycle des folates sont majoritairement diminués dans les « tumor spheres »

*Le vert indique les gènes sous-exprimés et le rouge les gènes sur-exprimés. * pvalue <0,05; ** pvalue <0,01; ***p value <0.001*

3.11. Autres transcrits à expression différentielle

Par ailleurs, l'analyse du transcriptome par RNAseq a montré une variation d'expression d'un très grand nombre de gènes qui ne sont pas directement liés au cycle de la méthionine. La liste (non exhaustive) est colligée dans le tableau 6 et regroupe des gènes impliqués dans plusieurs processus cellulaires comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, l'adhésion, la chaîne respiratoire de la mitochondrie, le « neural stemness » ou encore le potentiel d'action, etc...

Tableau 6 Liste des principaux gènes impliqués dans des processus cellulaires divers et qui présentent une variation d'expression entre les tumor spheres et les monolayers, d'après l'analyse RNASeq

Gene symbol	Fold change	Role
HR	- 82X	Histone demethylase that specifically demethylates both mono- and dimethylated Lys-9 of histone H3. May act as a transcription regulator controlling hair biology (via targeting of collagens), neural activity, and cell cycle. Transcriptional corepressor of nuclear receptors (thyroid hormone receptor), retinoic acid receptor and vitamin D receptors.
ID1	-50X	Cell growth, senescence & differentiation. Inhibitors of DNA binding, HLH proteins. Act with HDAC1 (deacetylase) and SMADs (stemness)
ID2	-10X	
ID3	-10X	
KCNB1	-59X	Voltage-gated potassium channel that mediates transmembrane potassium transport in excitable membranes, primarily in the brain, but also in the pancreas and cardiovascular system. Contributes to the regulation of the action potential (AP) repolarization, duration and frequency of repetitive AP firing in neurons, muscle cells and endocrine cells and plays a role in homeostatic attenuation of electrical excitability throughout the brain
DNAJC15	-57X	Negative regulator of the mitochondrial respiratory chain. Prevents mitochondrial hyperpolarization state and restricts mitochondrial generation of ATP (By similarity). Acts as an import component of the TIM23 translocase complex. Stimulates the ATPase activity of HSPA9
ANXA3	-31X	This gene encodes a member of the annexin family. Members of this calcium-dependent phospholipid-binding protein family play a role in the regulation of cellular growth and in signal transduction pathways. This protein functions in the inhibition of phospholipase A2 and cleavage of inositol 1,2-cyclic phosphate to form inositol 1-

		phosphate. This protein may also play a role in anti-coagulation.
LRRC2	-29X	This gene encodes a member of the leucine-rich repeat-containing family of proteins, which function in diverse biological pathways. This family member may possibly be a nuclear protein. Similarity to the RAS suppressor protein, as well as expression down-regulation observed in tumor cells, suggests that it may function as a tumor suppressor.
BMF	-19X	The protein encoded by this gene belongs to the BCL2 protein family. BCL2 family members form hetero or homodimers and act as anti- or pro-apoptotic regulators that are involved in a wide variety of cellular activities. This protein contains a single BCL2 homology domain 3 (BH3), and has been shown to bind BCL2 proteins and function as an apoptotic activator. This protein is found to be sequestering to myosin V motors by its association with dynein light chain 2, which may be important for sensing intracellular damage and triggering apoptosis. Alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been identified. Among its related pathways are Apoptosis and Autophagy and Activation of BH3-only proteins. May play a role in apoptosis. Isoform 1 seems to be the main initiator
LRP2	X150	LDL that interacts directly with cubulin (CUBN - intrinsic factor-cobalamin receptor- x2 in TS) so link with fat-soluble vitamins uptake (endocytosis) Low-density lipoprotein-related protein 2 also known as LRP2 or megalin. LRP2 can also form complexes with cubilin: those complexes are able to reabsorb several molecules and can be inhibited by sodium maleate.
NTRK2	X182	Regulates growth and survival directly activating MAPK & PI3K pathways – neuron differentiation
POSTN	X863	Secreted extracellular matrix protein – glioma stem cells secreted periostin – interacts with integrins
NPTN	X790	Adhesion – survival – integrins. Probable homophilic and heterophilic cell adhesion molecule involved in long-

		term potentiation at hippocampal excitatory synapses through activation of p38MAPK. May also regulate neurite outgrowth by activating the FGFR1 signaling pathway. May play a role in synaptic plasticity
VAV3	X71	Oncogene, exchange factor for GTP-binding proteins RhoA, RhoG and, to a lesser extent, Rac1. Binds physically to the nucleotide-free states of those GTPases. Plays an important role in angiogenesis. Its recruitment by phosphorylated EPHA2 is critical for EFNA1-induced RAC1 GTPase activation and vascular endothelial cell migration and assembly (By similarity). May be important for integrin-mediated signaling, at least in some cell types. In osteoclasts, along with SYK tyrosine kinase, required for signaling through integrin alpha-v/beta-1 (ITAGV-ITGB1), a crucial event for osteoclast proper cytoskeleton organization and function. This signaling pathway involves RAC1, but not RHO, activation. Necessary for proper wound healing. In the course of wound healing, required for the phagocytotic cup formation preceding macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. Responsible for integrin beta-2 (ITGB2)-mediated macrophage adhesion and, to a lesser extent, contributes to beta-3 (ITGB3)-mediated adhesion. Does not affect integrin beta-1 (ITGB1)-mediated adhesion (By similarity).
XIST	X771	X inactivation via chromatin silencing (LINC RNA that binds to DNA and prevents transcription) – also recruits methylation complexes for prolonged silencing
PMP2	X352	Peripheral myelin protein -> stemness
SEMA6D	X64	Neuron connections -> stemness

4. L'analyse du méthylome révèle que certains gènes impliqués dans le cycle des folates ont des promoteurs hypométhylés

4.1. Description générale

Pour déterminer si des mécanismes épigénétiques sont impliqués dans la méthionine dépendance des « tumor spheres » U251, nous avons comparé le méthylome de ces cellules souches cancéreuses à celui des cellules adhérentes en utilisant la technologie des puces Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip, couvrant 486 428 sites CpG.

À notre grande surprise, malgré les changements à très grande échelle de la transcription révélés par le RNA-Seq, le profil global de méthylation de l'ADN est resté plutôt stable, enregistrant seulement des changements d'amplitude mineurs associés aux régions hyper- ou hypo-méthylées couvertes par 15 037 sondes avec une FDR < 0.01 (pour False Discovery Rate, une correction de la p-value) ou 33 321 sondes avec FDR < 0.05.

4.2. Les DMR modifiées

Des analyses plus approfondies ont montré que la série de sondes à FDR < 0.05 correspondait à 3912 DMR (Differentially Methylated Region), avec un minimum de 3 sondes CpG dans chaque DMR (et un écart maximal entre chaque sonde de 1kb), parmi lesquelles 2032 régions étaient hypométhylées (Figure 49 en vert, parties B et C) et 1880 régions hyperméthylées (Figure 49 en rouge, parties B et C). Ces 3912 DMR ont été associées physiquement aux positions des promoteurs connus pour 3514 gènes uniques. Un chevauchement d'une DMR avec une région promotrice située à moins de 2kb a été considéré comme une association valide. Ces gènes comprennent : des gènes impliqués dans le cycle des folates comme MTHFD2, MTRR, MTHFR, MRI1, GOT1L1 (Figure 49, diamants violets, partie D), des gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme CCNA1, CCNH, CCNO, E2F2, CDKN1A (1B, 1C, 2A, 2B, 2C), DNMT3A, MAPK4, TGFB3 (123 gènes, 19.3% d'une liste de 637 acteurs du cycle cellulaire compilée à partir de MSigDB ; astérisques noirs, partie D) et des gènes appartenant à la signature « neural stemness » comme CLU, SMAD3, ID1, ID3, FGF10, ELF4, SOX6 (24 gènes, 24% ; carrés croisés bleus, partie D). Les ARN non codants (618 gènes ; 17.6%) présentent aussi une méthylation de l'ADN altérée. Les fonctions biologiques

les plus altérées sur le transcriptome étant le cycle cellulaire et la signature « neural stemness », nous observons ici qu'un fort pourcentage des transcrits impliqués dans ces fonctions ont des promoteurs significativement hypo ou hyper-méthylés dans les « tumor spheres ».

4.3. Intégration transcriptome/ méthylome

Plusieurs promoteurs de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, sous-exprimés dans les tumor spheres, comportent aussi des DMR hyperméthylées comme SMAD3 (méthylation moyenne augmentée de 4%) et E2F2 (méthylation moyenne augmentée de 7.9%). Certains gènes codants les histones (sous-exprimés dans les « tumor spheres ») sont hyperméthylés : comme HIST1H4H (+ 0.78%) et HIST1H31-00 (+3%). Curieusement, le lincRNA, linc00240, appartenant au cluster HIST1 sur le chromosome 6 et sur-exprimé dans les « tumor spheres » est modérément hypométhylé (- 0.4%). L'analyse du méthylome a révélé que les gènes, ayant un potentiel « stemness », sur-exprimés dans les « tumor spheres », ont un promoteur hypométhylé comme BDNF (-5,6%), CLU (-6,3%), ELF4 (-0.44%), FGF10 (-2%), GFAP (-7%), TBX3 (-4%) alors que ceux qui sont sous-exprimés ont un promoteur hyperméthylé comme FZD7 (+2,4%), ID1 (+7,6%), ID3 (+9,3%), KLF4 (+1,77%).

Par ailleurs, plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des groupements monocarbonés ont un profil de méthylation dérégulé. Une analyse intégrative plus approfondie a révélé que 4582 gènes comportent chacun au moins 3 sondes négativement corrélées avec l'expression des transcrits correspondants ($r < -0.33$) (Figure 49, partie E). Pour être informatives, ces sondes doivent être localisées dans des zones proches des sites d'initiation de la transcription (1,5 kb maximum) (Murphy *et al.*, 2013). Cette corrélation négative implique que l'expression des transcrits augmente significativement lorsque la méthylation diminue et inversement. Cette hypothèse ne couvre bien sûr pas tous les cas de figure mais procure une vision représentative du profil général de méthylation-transcription et présente le mérite d'intégrer les données sans *a priori*. La liste des gènes négativement corrélés comprend 33 gènes parmi les 139 gènes explorés impliqués dans le cycle des monocarbonés. Cependant, seulement 15 gènes sont significativement négativement corrélés: 10 gènes sont sous-exprimés et généralement hyperméthylés dans les « tumor spheres » (tableau 7) alors que 5 gènes sont sur-exprimés et hypométhylés (tableau 8). Parmi ces 15 gènes, ceux qui sont impliqués dans le cycle des folates sont les suivants : MTHFSD, MTR, MTRR, SHMT1 sont

sous-exprimés et hyperméthylés et DHFR1, MTFMT et MTHFR sont sur-exprimés et hypométhylés.

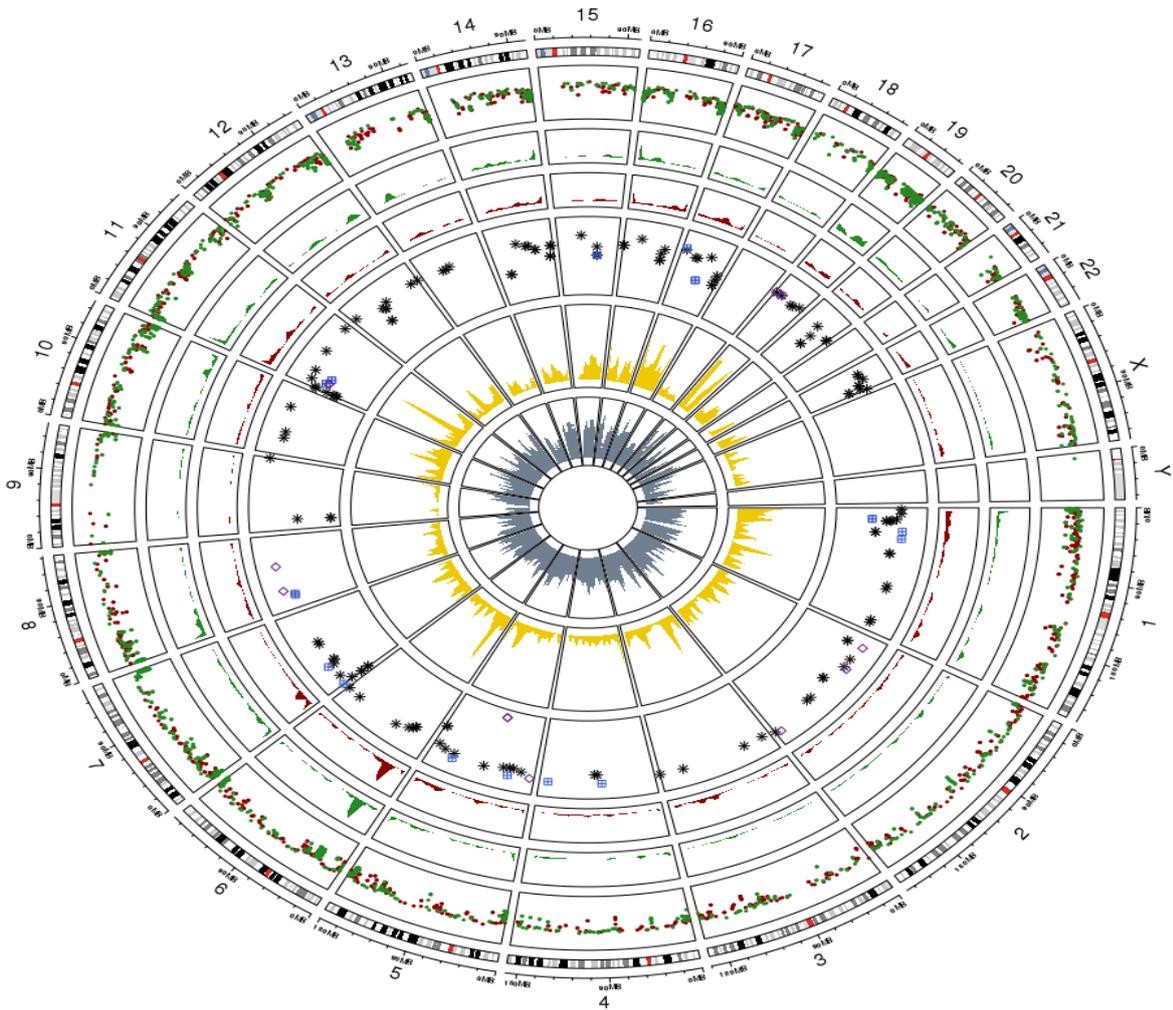


Figure 49: Profil de méthylation des « tumor spheres » par rapport aux cellules adhérentes et lien avec les variations de transcription observées.

Le profil de méthylation à échelle génomique entre ML et TS décrit l'utilisation cellulaire de la méthylation de l'ADN pour la reprogrammation de la pluripotence et des voies du cycle cellulaire. De l'extérieur vers l'intérieur: **A)** Organisation chromosomique avec idéogrammes. Les centromères sont en rouge (piste la plus à l'extérieur). **B)** Représentation en « rainfall » du panorama génomique des DMR. Les régions globalement hyperméthylées (1880 régions) et hypométhylées (2032 régions) sont représentées respectivement en rouge et en vert. La distance d'un DMR donné avec celui qui le précède est tracée sur l'axe des ordonnées dans une échelle logarithmique. **C)** Les densités génomiques des DMR hypométhylés (piste verte) et hyperméthylés (piste rouge). **D)** Représentation en « rainfall » des DMR liées aux régions

promotrices contrôlant les gènes clés du cycle cellulaire (**astérisques noirs**), les gènes de la signature dérivée des cellules souches cancéreuses neuronales (**carrés croisés bleus**) et les gènes des voies métaboliques de l'acide folique / cobalamine / monocarbonate (**diamants violets**). **E)** Densité génomique (en jaune) de 4582 régions promotrices montrant des corrélations entre les changements du méthylome et du transcriptome. Au moins 3 sondes doivent se corrélérer négativement (avec $r \leq -1/3$) entre leur méthylation et leur niveau d'expression pour un transcrit donné (Murphy et al., 2013). **F)** Densité génomique de tous les transcrits connus et annotés (piste la plus à l'intérieur), pour comparaison avec les densités de corrélations dans la partie E.

Tableau 7: Les gènes sous-exprimés et négativement corrélés dans les « tumor spheres » impliqués dans le cycle des monocarbone

Position de l'îlot CpG	Nombre de sondes	Gène	Méthylation FC %	Transcrit	FC (Ratio) transcriptome	Nb de transcrits
chr2:216176549-216177132	3 de 10	ATIC	0,276086574	ENST00000236959	0,664662513	1
chr8:63951122-63952104	3 de 9	GGH	0,845784113	ENST00000260118	0,329378763	1
chr10:101190451-101190925	4 de 8	GOT1	0,068995095	ENST00000370508	0,874887164	1
chr16:58767447-58768328	3 de 8	GOT2	0,807289784	ENST00000245206	0,694219236	1
chr16:86588435-86589513	8 de 48	MTHFSD	0,73649178	ENST00000543303	0,823446074	1
chr1:236958314-236959202	4 de 9	MTR	0,198660392	ENST00000366577	0,738097544	1
chr5:7868863-7869840	16 de 28	MTRR	0,300783011	ENST00000264668	0,616138895	1
chr17:18266422-18267007	5 de 14	SHMT1	0,341459889	ENST00000316694	0,90226452	2
				ENST00000354098	0,507527661	
chrX:21958611-21959701	3 de 8	SMS	1,190022389	ENST00000328923	0,553262138	1
chr2:73114219-73114920	3 de 9	SPR	0,821248434	ENST00000404933	0,811852574	1

Tableau 8: Les gènes sur-exprimés et négativement corrélés dans les « tumor spheres » impliqués dans le cycle des monocarbone.

Position de l'îlot CpG	Nombre de sondes	Gène	Méthylation FC %	Transcrit	FC (Ratio) transcriptome	Nb de transcrits
chr6:111195383-111197576	4 de 10	AMD1	-0,308064278	ENST00000368885	1,947884122	1
chr3:93781648-93782108	4 de 11	DHFRL1	-0,264711681	ENST00000314636	1,276256831	1
chr6:42928218-42928810	3 de 29	GNMT	-3,14402533	ENST00000372808	1,809063365	1
chr15:65321431-65321996	4 de 5	MTFMT	-0,885085675	ENST00000220058	1,571629321	1
chr1:11865462-11866566	5 de 8	MTHFR	-3,731408999	ENST00000376590	3,986890845	1

5. Implication du cycle des Folates dans le mécanisme de méthionine dépendance des Tumor spheres.

Le RNA-seq a révélé que le cycle des folates est ralenti dans les “tumor spheres” comparativement aux cellules adhérentes. Nous avons effectués les expérimentations suivantes pour préciser le fonctionnement du cycle des folates dans les “tumor spheres”.

5.1. Les gènes du cycle des folates sont sous-exprimés dans les « tumor spheres ».

L’immunocytochimie réalisée sur cellules adhérentes et « tumor spheres » montre que DHFR, SHMT1, MTHFD1 et MTHFD2 (tous impliqués dans le cycle des folates) sont sous-exprimés dans les « tumor spheres » (Figure 50). Par contre, MTR et CARM1 sont sur-exprimés dans les « tumor spheres », résultat conforme aux connaissances actuelles sur les « tumor spheres ». En effet, la MTR approvisionne la cellule en méthionine et CARM1 méthyle les arginines de nombreuses protéines : ces 2 événements contribuent à maintenir la pluripotence (Shiraki *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2009).

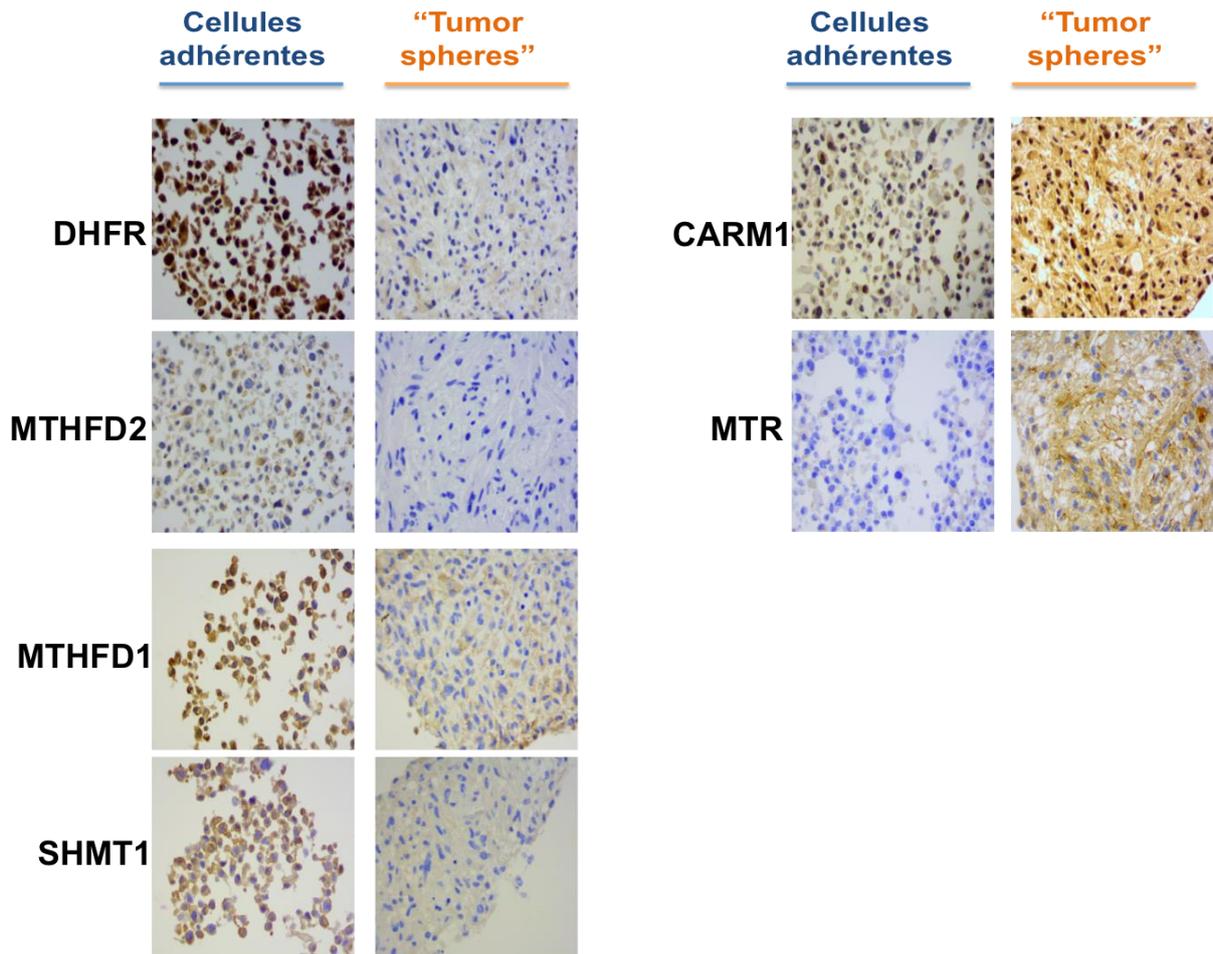


Figure 50: les gènes du cycle des folate sont sous-exprimés dans les tumor spheres.

DHFR, MTHFD1-2 et SHMT1 sont sous-exprimés dans les « tumor spheres » par comparaison avec les cellules adhérentes, alors que MTR et CARM1 sont sur-exprimés. L'immunocytochimie a été réalisée après fixation des cellules par la formaline et après intégration dans la paraffine, en utilisant des anticorps dirigés contre DHFR, MTHFD2, MTHFD1 et SHMT1, CARM1 et MTR.

5.2. L'activité des enzymes impliquées dans le cycle des folates est diminuée dans les tumor spheres

Nous avons examiné les activités des enzymes clés impliquées dans le cycle des folates en utilisant les « tumor spheres » formées en présence de méthionine. Le milieu de culture additionné de méthionine dans lequel sont cultivées les “tumor spheres” a été retiré et les “tumor spheres” ont été maintenues dans un milieu sans méthionine (DMEM No methionine High Glucose No Glutamine No Cystine contenant 6.6 uM d'acide folique) pendant 24h, ensuite ce milieu a été supplémenté en ¹³C formate (300uM) et acide folique (11uM) pendant 24h.

La méthionine est un régulateur allostérique qui intervient dans plusieurs étapes dans le cycle des monocarbone et qui régule le cycle des folates. Le fait de retirer la méthionine permet d'examiner un cycle des folates qui ne subit plus de régulation allostérique. L'acide folique est un substrat qui entre dans le cycle des folates sous forme de DiHydroFolate (DHF) réduit ensuite en TetraHydroFolate (THF). Le ^{13}C formate est aussi un substrat qui rejoint le cycle des folates comme 10-formyle tetrahydrofolate. Il va marquer le carbone (C) du groupement méthyle (CH_3) qui est fixé à l'atome d'azote (N) en position 5 sur le 5-méthyle tetrahydrofolate et va permettre de tracer le 10-formyle tetrahydroFolate, le 5,10 méthényle tetrahydrofolate, le 5,10 méthylène tetrahydrofolate, le 5-méthyle tetrahydrofolate et la méthionine puisque le groupement méthyle est transféré du 5-méthyle tetrahydrofolate vers l'homocystéine pour donner la méthionine (Figure 15). Ainsi, l'acide folique et le ^{13}C formate donnent des informations complémentaires. L'addition d'acide folique entraîne l'augmentation de la production des isoformes des folates. La mesure des isoformes des folates permet d'estimer l'activité des enzymes qui interviennent dans les interconversions entre ces isoformes. Les isoformes tetrahydrofolate (THF), méthyle tetrahydrofolate (MeTHF), méthylène tetrahydrofolate (MnTHF), formyle tetrahydrofolate (FTHF), acide folique (ac fol) et les dérivés marqués avec ^{13}C ont été mesurés par spectrométrie de masse. Les isoformes des folates mesurés permettent notamment d'estimer l'activité de SHMT1 et MTHFR. La détection du ^{13}C explore les étapes qui séparent le formate de la méthionine et permet d'estimer notamment l'activité des enzymes FTHFS, MTHFD1 et MTHFR (Figure 15).

Un contrôle négatif a été préparé dans lequel le milieu des "tumor spheres" n'a pas été supplémenté ni en acide folique ni en formate. Les cellules adhérentes ont été traitées exactement avec les mêmes conditions que les "tumor spheres". Ainsi, nous avons comparé 4 culots de "tumor spheres" supplémentées en acide folique et formate, 4 culots de "tumor spheres" non supplémentées, 4 culots de cellules adhérentes supplémentées en acide folique et formate et 4 culots de cellules adhérentes non supplémentées.

Pour une raison inconnue, l'incorporation de ^{13}C dans les isoformes n'a pas été détectée. Une des hypothèses serait que la concurrence entre l'acide folique et le ^{13}C formate, puisque les 2 ont été ajoutés en même temps, aurait tourné en faveur de l'acide folique et que la cellule aurait utilisé majoritairement l'acide folique pour synthétiser les isoformes. Toujours

est-il que la mesure de l'incorporation de ^{13}C n'a pas pu être utilisée pour estimer l'activité des enzymes impliquées dans le cycle des folates et par conséquent, l'estimation de cette activité a reposé uniquement sur la mesure des isoformes des folates.

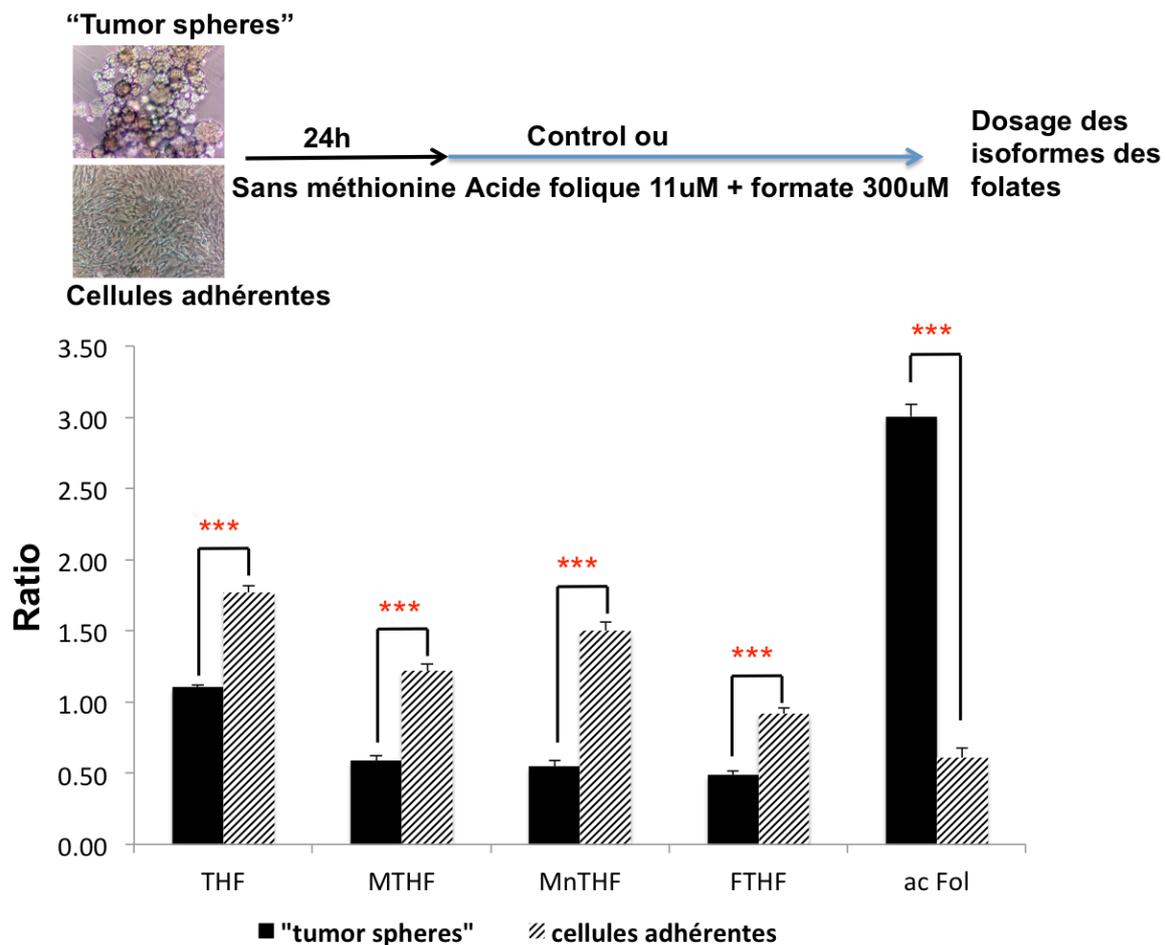
La production des isoformes des folates a été comparée entre les "tumor spheres" et les cellules adhérentes. Le but était de déceler une différence d'activité dans le cycle des folates entre les "tumor spheres" et les cellules adhérentes

Les comparaisons ont été effectuées grâce à un ratio calculé de la façon suivante: la concentration d'un isoforme a été normalisée sur la concentration des protéines totales dans les cellules supplémentées en acide folique puis la valeur obtenue a été divisée par la concentration du même isoforme normalisée sur la concentration des protéines totales dans les cellules non supplémentées en acide folique.

$$\text{Ratio} = \frac{\left\{ \frac{[\text{isoforme folates}]}{[\text{protéines}]} \right\} \text{ dans cellules supplémentées en acide folique et formate}}{\left\{ \frac{[\text{isoforme folates}]}{[\text{protéines}]} \right\} \text{ dans cellules non supplémentées en acide folique et formate}}$$

L'addition de substrats (formate et acide folique) révèle que dans les « tumor spheres » la production des isoformes des folates est significativement inférieure à celle mesurée dans les cellules adhérentes. Ce résultat suggère que les activités des enzymes impliquées dans le cycle des folates sont réprimées dans les « tumor spheres » (Figure 51).

D'autre part, nous avons effectué un autre type de comparaison en utilisant les concentrations des isoformes des folates normalisées sur la concentration des protéines totales (Figure 52). Nous avons trouvé que les productions de méthyle et méthylène tetrahydrofolate sont plus faibles dans les « tumor spheres » quand elles sont stimulées par l'acide folique que quand elles ne le sont pas. Le phénomène inverse est observé dans les cellules adhérentes monocouches. Quand ces cellules sont stimulées par l'acide folique, elles produisent des quantités plus grandes de méthyle et méthylène tetrahydrofolate que quand elles ne sont pas stimulées. Ce résultat indique aussi que le cycle des folates est dérégulé dans les « tumor spheres » mais pas dans les cellules adhérentes monocouche.



Isoformes des Folates

Figure 51: L'activité enzymatique du cycle des folates est diminuée dans les “tumor spheres”

Après addition d'acide folique dans un milieu carencé en méthionine, la production des isoformes des folates est significativement plus faible dans les “tumor spheres” que dans les cellules adhérentes. Nombre d'échantillons (n) = 4 ; *** : p<0,001. Les cellules U251 adhérentes et les “tumor spheres” sont carencées en méthionine pendant 24h puis supplémentées avec acide folique = 11uM et formate = 300uM pendant 24h. Les isoformes des folates sont ensuite dosés par LCMSMS. Les comparaisons sont effectuées entre “tumor spheres” et cellules adhérentes en utilisant un ratio qui divise la concentration des isoformes des folates normalisée sur la concentration des protéines dans les cellules supplémentées en acide folique et formate sur la concentration des isoformes des folates normalisée sur la concentration des protéines dans les cellules non supplémentées. THF: Tétrahydrofolate, MTHF: méthylatétrahydrofolate, MnTHF: méthylènetétrahydrofolate, FTHF: formyltétrahydrofolate, ac Fol: acide folique

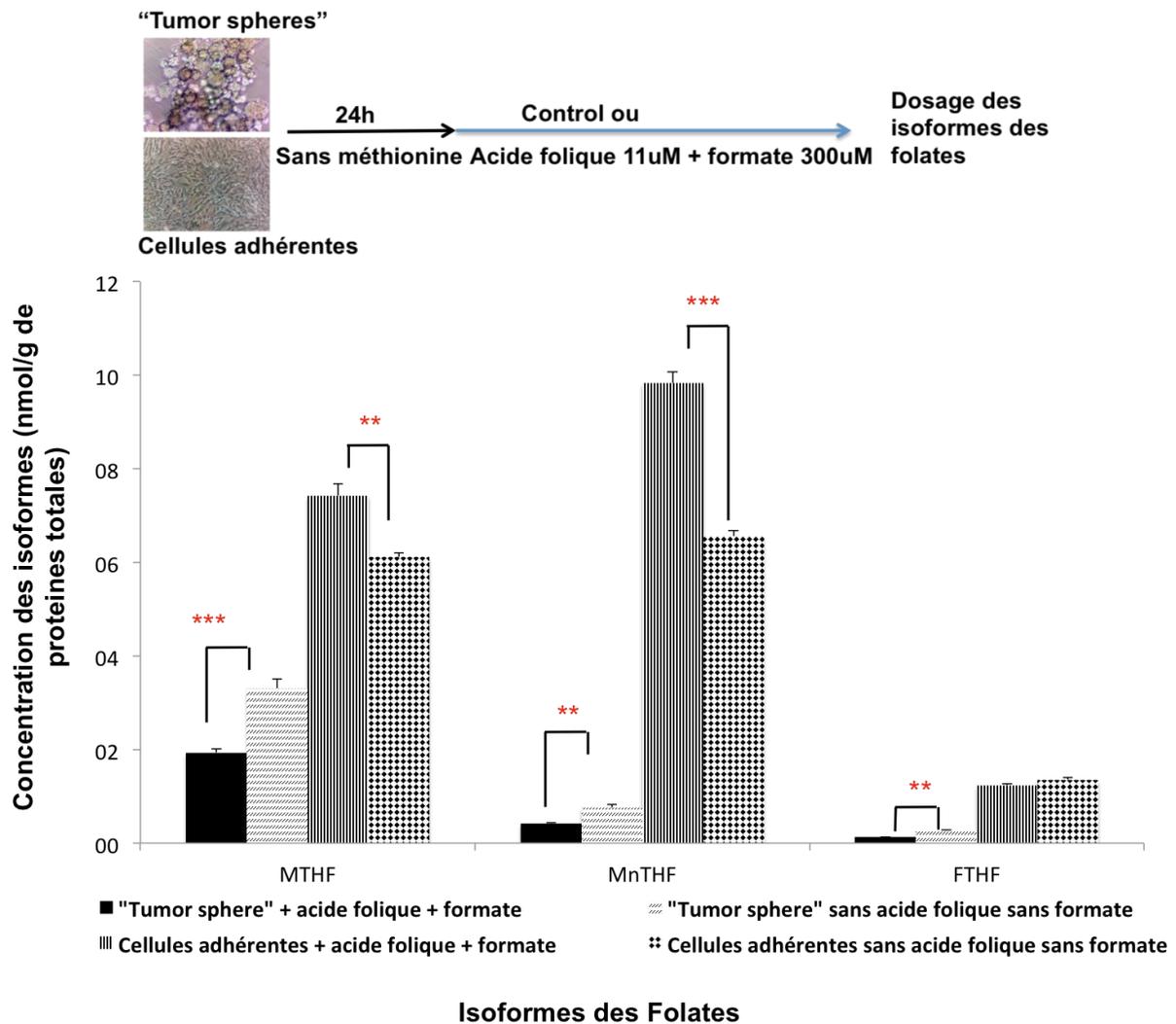


Figure 52: Dans les “tumor spheres” le cycle des folates répond mal à la stimulation avec l’acide folique.

La stimulation avec l’acide folique augmente la production de méthyle et méthylène tetrahydrofolate dans les cellules adhérentes monocouche mais pas dans les « tumor spheres » ($n = 4$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$). Les cellules U251 adhérentes et les “tumor spheres” sont carencées en méthionine pendant 24h puis supplémentées avec acide folique = 11uM et formate = 300uM pendant 24h. Les isoformes des folates sont ensuite dosés par LCMSMS. Les “tumor spheres” supplémentées en acide folique et formate sont comparées aux “tumor spheres” non supplémentées et les cellules adhérentes supplémentées en acide folique et formate sont comparées aux cellules adhérentes non supplémentées en utilisant la concentration des isoformes des folates normalisées sur la concentration des protéines. THF: Tétrahydrofolate, MTHF: méthyltetrahydrofolate, MnTHF: méthylènetétrahydrofolate, FTHF: formyltétrahydrofolate, ac Fol: acide folique

5.3. L'addition de meTHF dans un milieu Met-Hcy+ restaure la formation des tumor spheres

Les « tumor spheres » ne se forment pas dans un milieu Met-Hcy+ (0.02 mM hcy + 0.02 mM B12) ce qui confirme qu'elles sont méthionine dépendantes. Cependant l'addition de 0.02 mM de méthyltetrahydrofolate dans le milieu Met-Hcy+ restaure la formation des « tumor spheres ». La formation des « tumor spheres » est dose dépendante jusqu'à des concentrations stoechiométriques de méthyle tetrahydrofolate et homocystéine égales à 0.02mM. Au-delà de cette concentration, le nombre des « tumor spheres » diminue. Cette allure en cloche rappelle la croissance des « tumor spheres » au cours de l'addition de doses croissantes de méthionine (Figure 53).

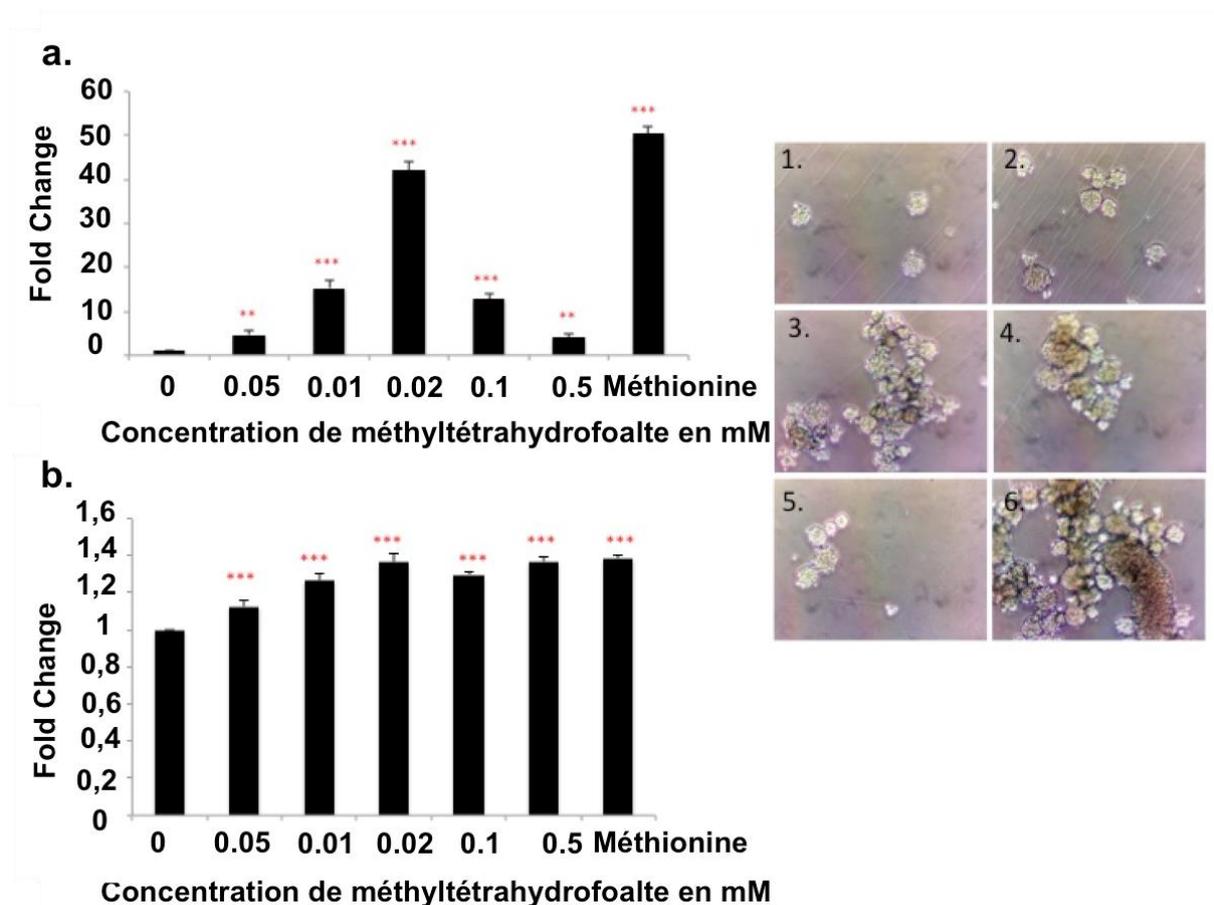


Figure 53: Le meTHF stimule significativement la croissance des U251 « tumor spheres » jusqu'à une dose optimale au-delà de laquelle l'effet sur la croissance s'amenuise.

Les cellules U251 « tumor spheres » et adhérentes sont cultivées dans le milieu DMEM, high glucose, no glutamine, no methionine, no cystine, contenant 6.6 μ M de folates, 8 pM de B12 et 20 μ M d'homocystéine. Une concentration croissante de meTHF est rajoutée comme indiquée sur la figure. Les comparaisons sont effectuées entre les cellules formées dans un

milieu contenant de la méthionine et celles formées dans un milieu déplété en méthionine.

**** $p < 0.001$*

a. La formation des « tumor spheres » est multipliée par un facteur 4, 15 et 42 après addition de meTHF à 0.005mM, 0.01mM, et 0.02 mM, respectivement; elle est multipliée “seulement” par un facteur 12 et 4 après addition de meTHF à 0.1mM et 0.5 mM, respectivement. Elle est multipliée par un facteur 50 dans le milieu standard des tumor spheres avec une concentration de 0,1 mM de méthionine.

b. La croissance des U251 monolayers est multipliée par un facteur 1,12 et 1,26 lors de l’ajout de meTHF à 0.005mM et 0.01mM, respectivement, et reste presque constante ensuite entre 0.02 mM et 0.5 mM de meTHF. Elle est multipliée par un facteur 1,38 dans un milieu standard de tumor spheres avec une concentration de 0,1mM de méthionine.

Photos 1, 2, 3 et 4 : Aspect des « tumor spheres » avec des concentrations de meTHF égales à 0,005 - 0,01 - 0.02 - 0.1 mM et 0,5mM respectivement. Photos 6 Aspect des « tumor spheres » avec 0,1mM de méthionine et sans ajout de meTHF

5.4. Les métabolismes des tumor spheres formées en présence de méthionine et de 5-méthyle tetrahydrofolate semblent différents

Nous avons utilisé les « tumor spheres » formées en présence de méthionine et celles formées en présence de 5-méthyle tetrahydrofolate pour doser les isoformes des folates et les comparer. La concentration a été exprimée en nmol/ gramme de protéines. Les quantités d’isoformes produites dans les « tumor spheres » formées en présence de méthionine sont significativement supérieures aux quantités produites dans « les tumor spheres » formées en présence de 5-méthyle tetrahydrofolate, ce qui suggère que ces 2 types de cellules ont des caractères phénotypiques différents (Figure 54)

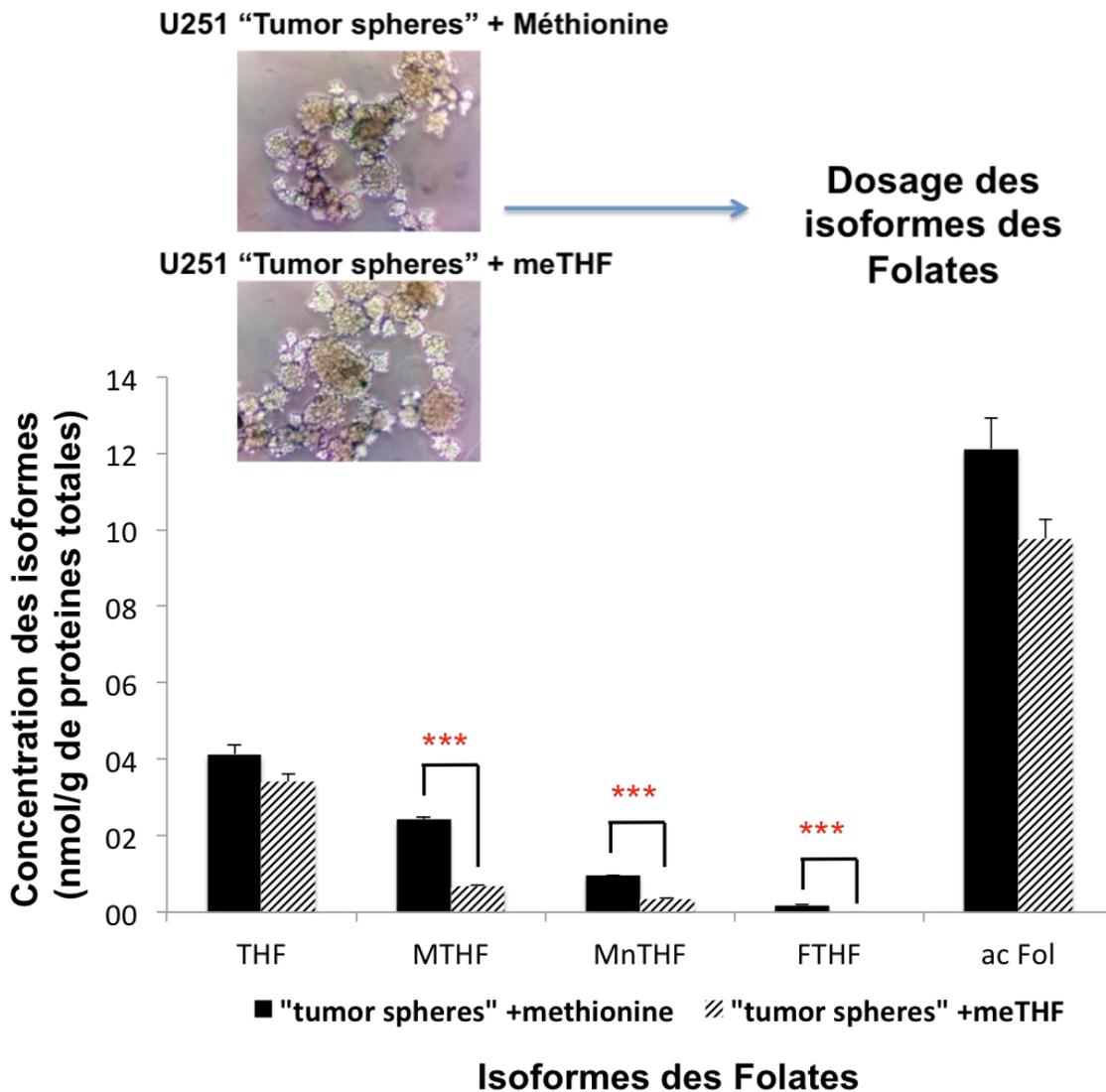


Figure 54: l'activité enzymatique du cycle des folates est plus forte dans les "tumor spheres" formées en présence de méthionine que dans celles formées dans un milieu met-hcy+ supplémenté en meTHF.

Les concentrations des isoformes des folates produits dans les "tumor spheres" en présence de méthionine sont supérieures à celles retrouvées dans les "tumor spheres" formées dans un milieu met-hcy+ supplémenté en meTHF. Nombre d'échantillons (n) =3, ***: p<0,001. Les "tumor spheres" ont été formées en présence de méthionine ou de meTHF pendant 3 passages puis les protéines ont été extraites et dosées et les isoformes des folates ont été dosés en LCMSMS. THF: Tétrahydrofolate, MTHF: méthyltétrahydrofolate, MnTHF: méthylènetétrahydrofolate, FTHF: formyltétrahydrofolate, ac Fol: acide folique

Discussion

Les acides aminés sont nécessaires à la croissance des cellules saines et malignes. Dans certains cancers, le besoin d'un apport exogène en acides aminés non essentiels est dû à des mutations affectant les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces acides aminés. Par exemple, certains ostéosarcomes et cancers de la vessie dépendent de l'arginine (Allen *et al.*, 2014; Kobayashi and Choyke, 2010), les cellules de la leucémie aigue lymphoblastique dépendent de l'asparagine (Lorenzi *et al.*, 2014), certains cancers du sein « basal-type » (Kung *et al.*, 2011; Timmerman *et al.*, 2013) et des cellules cancéreuses avec Myc et Ras activés (Gao *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2013) de la glutamine et certains mélanomes ont une leucine dépendance causée par une altération de l'autophagie (Sheen *et al.*, 2011). Les gènes GLS (glutaminase qui catalyse l'hydrolyse du glutamine en glutamate), PHGDH (phosphoglycerate dehydrogenase qui intervient dans les premières étapes de la synthèse de la serine), SHMT2 (serine hydroxymethyltransferase 2 ou l'enzyme qui catalyse la réaction réversible de la sérine et du tétrahydrofolate en glycine et 5,10-méthylène tétrahydrofolate), GLDC (glycine décarboxylase qui code pour la protéine P qui se lie à la glycine et permet au groupe méthylamine de la glycine d'être transféré à la protéine T) et ASNS (asparagine synthétase), comptent parmi ceux qui abritent fréquemment des mutations altérant l'utilisation des acides aminés (Tsun and Possemato, 2015).

De manière surprenante, les cellules normales et de nombreuses cellules cancéreuses n'ont pas besoin de méthionine pour proliférer, peut-être parce que la méthionine est produite de manière continue dans la cellule grâce à une synthèse de novo et un cycle de sauvetage. Cependant, il existe des cancers méthionine-dépendants comme les leucémies, les lymphomes, les hépatomes, les carcinomes pulmonaires, les carcinomes mammaires, les neuroblastomes et les carcinomes de la vessie (Hoffman, 1982).

Les mécanismes responsables de la méthionine dépendance varient selon le type cellulaire considéré. En s'appuyant sur l'observation selon laquelle certaines cellules cancéreuses méthionine dépendantes produisent une quantité normale de méthionine mais ne parviennent pas à convertir efficacement la méthionine en SAM, il a été suggéré que la méthionine dépendance pouvait être due à une utilisation dérégulée de la méthionine dans la cellule (Coalson *et al.*, 1982). Cette hypothèse a été renforcée par la constatation que dans de nombreuses cellules cancéreuses méthionine dépendantes, les ARNt sont excessivement

méthylés et les bases méthylées sont excessivement excrétées (Stern and Hoffman, 1984; Tisdale, 1980a)

Il a aussi été proposé que la méthionine dépendance pouvait être expliquée par la présence de mutations dans la voie de synthèse *de novo* ou la voie de sauvetage de la méthionine (Cavuoto and Fenech, 2012). C'est ainsi que diverses enzymes ont été mises en cause dans la méthionine dépendance comme: MTAP (methylthioadenosine phosphorylase) qui clive MTA (methylthioadenosine) et génère des substrats précurseurs dans les cycles de sauvetage de la méthionine et de l'adénine (Behrmann *et al.*, 2003; Garcia-Castellano *et al.*, 2002; Komatsu *et al.*, 2008; M'Soka T *et al.*, 2000; Nobori *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1998), MTR (méthionine synthase) qui méthyle l'homocystéine en méthionine dans la voie de synthèse *de novo* (Kenyon *et al.*, 2002; Sharp and Little, 2004); MTHFR (méthylène tétrahydrofolate réductase) qui catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyle tétrahydrofolate qui est le donneur de groupement méthyle pour méthyle l'homocystéine en méthionine (Beetstra *et al.*, 2008); MMACHC (methylmalonic aciduria cobalamin deficiency cblC type with homocystinuria) impliqué dans la fixation et le "trafficking" de la vitamine B12 qui est le co-facteur de la MTR (Loewy *et al.*, 2009). Cependant ces hypothèses n'ont pas été constamment confirmées. Plusieurs études ont montré que les concentrations de MTR sont similaires dans les cellules malignes méthionine dépendantes et les cellules normales (Stern *et al.*, 1984). Une autre étude a démontré que dans les cellules carcinomateuses Walker-256 méthionine dépendantes l'addition de 5-méthyle tétrahydrofolate n'a pas d'effet sur la méthionine dépendance suggérant ainsi que MTHFR ne contribue pas à définir le phénotype dans ces cellules (Tisdale, 1980b). De plus, le rôle de MTAP a été exclu dans la méthionine dépendance des cellules MCF7 (Tang *et al.*, 2000a) et l'analyse d'un grand panel de lignées cellulaires tumorales a conclu qu'il était peu probable que le dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine B12 soit une cause commune de méthionine dépendance (Watkins, 1998).

Ainsi, de nombreux phénotypes métaboliques cellulaires sont-ils associés à la méthionine dépendance et il n'existe pas un déficit enzymatique unique qui explique pourquoi la croissance de certaines cellules cancéreuses est dépendante de la méthionine.

Alternativement, la méthionine dépendance peut être la cause d'un besoin accru de méthionine. Cela semble être le cas pour les gliomes humains, car la concentration de méthionine dans ces tissus tumoraux est plus élevée que dans les tissus normaux. Pour comprendre la méthionine dépendance des gliomes, nous nous sommes concentrés sur le glioblastome, l'une des tumeurs les plus agressives connues. Nous avons travaillé sur les cellules U251 et nous avons observé qu'en condition de culture adhérente, ces cellules ne nécessitent pas de méthionine pour leur croissance, mais lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions non-adhérentes, elles forment des sphères tumorales (tumor spheres) uniquement en présence de méthionine. Comme les « tumor spheres » des cellules U251 présentent les caractéristiques classiques des cellules souches cancéreuses (expression des marqueurs de pluripotence, capacité de différenciation en plusieurs lignages cellulaires), nous proposons ici que la dépendance à la méthionine des cellules U251 est un besoin métabolique imposé par la formation des cellules souches cancéreuses.

En fait, les cellules U251 adhérentes monocouches (monolayers) poussent sans méthionine mais l'addition de méthionine exogène augmente modérément leur prolifération (X2). Il est donc probable que les cellules U251 adhérentes monocouche produisent une quantité suffisante de méthionine endogène pour leur croissance, et que la supplémentation en méthionine exogène ait uniquement un rôle de modulation par le biais d'un contrôle translationnel et transcriptionnel qui entraîne une augmentation modérée de la croissance (Zou *et al.*, 2017). Etant donné que dans des conditions de culture non-adhérentes, les « tumor spheres » se forment uniquement si la méthionine est ajoutée dans le milieu, nous suggérons que ce besoin en méthionine soit dû à la reprogrammation des cellules U251 vers un phénotype non différencié. Cette dédifférenciation rappelle la situation observée dans les cellules souches normales. En effet, il a été établi que des concentrations élevées de méthionine et de SAM sont indispensables pour maintenir l'état non différencié des cellules souches embryonnaires pluripotentes et réguler leur différenciation (Shiraki *et al.*, 2014). La préservation du caractère pluripotent (stemness) des cellules souches semble être lié à la capacité de la cellule à méthyler des métabolites comme le nicotinamide, l'adénosine des ARN (m6A), l'ADN (mCG) et les histones (résidus arg et lys) (Aguilo *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2017; Li and Zhao, 2008; Minton, 2014; Pissios, 2017; Wutz, 2013). Les connaissances actuelles ne permettent pas de dire si ces méthylations sont aussi des marqueurs des

cellules souches cancéreuses. En plus de la méthionine, d'autres aminoacides exercent un effet négatif sur la croissance des cellules souches humaines pluripotentes comme la leucine et la lysine, mais cet effet semble limité (Kilberg *et al.*, 2016; Shiraki *et al.*, 2014). La privation en méthionine apparaît comme étant la plus efficace pour inhiber la croissance des cellules souches, en diminuant la pluripotence, facilitant l'apoptose, rallongeant la phase G0 / G1 et réduisant le nombre. L'impact des acides aminés sur le développement embryonnaire avant l'étape 8-cellules est bien documenté. Par exemple, lors de la culture embryonnaire *in vitro*, l'addition d'acides aminés non essentiels favorise la formation des blastocytes alors que la restriction entraîne un arrêt de l'embryon à l'étape 2-cellules (Gardner, 1998).

La question qui se pose est de savoir quelle est la quantité de méthionine qui doit être disponible lors de la dédifférenciation des cellules adhérentes monocouches vers les cellules souches cancéreuses. Nos résultats montrent que la formation optimale des cellules souches cancéreuses nécessite une quantité relativement basse de méthionine exogène, égale à 10 uM, par comparaison avec la concentration intracellulaire de méthionine dans les tissus qui est habituellement égale à 30-40 uM (Duncan *et al.*, 2013). Il est possible que la production de méthionine endogène devienne insuffisante au cours de la dédifférenciation vers l'état de cellules souches et qu'il soit nécessaire de rajouter de la méthionine exogène pour que les cellules souches se forment. Le besoin en méthionine semble être beaucoup plus grand dans les cellules souches non cancéreuses puisque des concentrations comprises entre 25 et 120 uM sont nécessaires pour une croissance optimale des cellules pluripotentes saines humaines *in vitro* (Shiraki *et al.*, 2014).

Afin de savoir s'il existe des altérations dans la synthèse de novo de la méthionine ou dans la voie de sauvetage, nous avons réalisé une analyse RNA-Seq sur les cellules U251 entre cellules adhérentes monocouches et cellules souches cancéreuses. La classification hiérarchique effectuée sur 23 048 gènes quantifiés *a minima* a révélé l'existence de 2 clusters dérégulés l'un contenant 4515 gènes sous-exprimés et l'autre 4756 gènes sur-exprimés. Ces 2 clusters représentent une modification drastique des programmes transcritomiques (40.2%) entre les cellules U251 adhérentes monocouches et les cellules souches cancéreuses dérivées. Les gènes sous-exprimés sont notamment impliqués dans le cycle cellulaire, le transport des ARN, la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN, la réparation des cassures de l'ADN par recombinaison homologue, la fixation des protéines non repliées

et divers processus de régulation allant de l'inhibition de la chromatine jusqu'à la régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'expression des gènes. Les gènes sur-exprimés sont impliqués dans la formation des neurones, la plasticité neuronale, le chimiotactisme et la guidance neuronal, la formation de la matrice extracellulaire et des protéoglycanes, le transport des ions, les protéines G et la transduction du signal impliquant Rho et Ras, la synthèse et le transport du cholestérol, la synthèse du phosphatidylinositol (PI3K) et la voie métabolique de l'AMPc.

Des modifications significatives de la transcription dans le cycle des folates ont également été mises en évidence, avec principalement une baisse de la transcription dans les cellules souches cancéreuses. La liste des gènes sous-exprimés comprend notamment SHMT, MTHFD, et DHFR. Nous émettons donc l'hypothèse que si les cellules souches cancéreuses ont besoin de quantités élevées de méthionine pour se former, c'est parce qu'elles présentent un déficit dans le cycle des folates qui provoque une transméthylation insuffisante et réduit la synthèse *de novo* de méthionine. Cette hypothèse est renforcée par plusieurs arguments. D'abord, en absence de méthionine exogène, l'addition de 5-méthyle tetrahydrofolate restaure la formation des cellules souches cancéreuses (Figure 53). Ensuite, quand elles sont stimulées par un excès de substrats après une restriction en méthionine qui dure 24h, les « tumor spheres » métabolisent moins de folates (y compris les méthyle tetrahydrofolate, méthylène tetrahydrofolate, formyl tetrahydrofoalte et tetrahydrofolate) que les cellules adhérentes monocouche (Figure 52). De plus, la stimulation par une forte concentration de substrats (acide folique = 11uM + 6.6 uM et formate = 300 uM) entraîne dans les « tumor spheres » une production d'isoformes des folates inférieure que la stimulation par une concentration de substrats plus faible (acide folique = 6.6 uM présent dans le milieu de culture sans addition de folates supplémentaire ni de formate) (Figure 52). Ceci suggère que si le cycle des folates est réprimé dans les « tumor spheres » en augmentant les substrats pendant la restriction en méthionine, il fonctionne normalement dans les cellules adhérentes monocouches où l'augmentation des substrats entraîne une augmentation des isoformes (Figure 52).

Ces résultats sont concordants avec les données du transcriptome qui montrent une diminution de la transcription des gènes impliqués dans le cycle des folates. La baisse de l'activité du cycle des folates apparaît comme un changement métabolique accompagnant la

dédifférenciation et la reprogrammation des monolayers en tumor spheres. Ce mécanisme est retrouvé dans les cellules souches embryonnaires (Shyh-Chang *et al.*, 2013b) ce qui signifie que les altérations métaboliques des cellules souches cancéreuses et normales sont similaires. Lors de la reprogrammation des cellules adhérentes monocouches vers les cellules souches cancéreuses, le 5,10-méthylène tétrahydrofolate intracellulaire (précurseur du 5-méthyle tétrahydrofolate) pourrait être dévié préférentiellement vers la synthèse des pyrimidines (plutôt que vers la production de 5-méthyle tétrahydrofolate qui alimente la voie de transméthylation) et, par conséquent, la supplémentation en méthionine exogène devient indispensable pour soutenir le flux des réactions de méthylation SAM dépendantes nécessaires au maintien de la pluripotence. L'augmentation de la demande en méthionine des cellules souches cancéreuses est donc la conséquence d'une production de méthionine endogène insuffisante.

Le fait que la courbe de méthionine dose/réponse (Figure 33) soit superposable à celle du 5-méthyle tétrahydrofolate (Figure 53) consolide l'idée selon laquelle dans les cellules souches cancéreuses, le 5-méthyle tétrahydrofolate exogène est utilisé préférentiellement pour la production de méthionine. Ces résultats sont conformes à des données publiées antérieurement indiquant que dans les cellules reprogrammées vers un état de cellules souches (stem-cell like state), il existe une synthèse de pyrimidines élevée associée à une baisse de la concentration intracellulaire de méthionine (Fernandez-Arroyo *et al.*, 2015) et une accélération du cycle de la méthionine (high-methionine metabolic state) (Shiraki *et al.*, 2014).

D'autre part, nous rapportons dans ce travail que l'addition de méthionine exogène favorise la formation des cellules souches cancéreuses selon une courbe en forme cloche : au-delà d'une dose optimale égale à 10 μ M, la méthionine ralentit la formation des cellules souches cancéreuses (Figure 33). Cette allure en forme de cloche ne semble pas exister pour les cellules saines pluripotentes puisqu'elles peuvent croître même en présence d'une concentration en méthionine atteignant 120 mM (Shiraki *et al.*, 2014). La raison de cette différence est inconnue mais il est vrai qu'une concentration élevée de méthionine inhibe la prolifération de certains cancers. En effet, il a été démontré que les cellules LNCaP (cancer prostate) et MCF-7 (cancer du sein) ne sont pas méthionine dépendantes et que toute addition de méthionine, jusqu'à une concentration maximum testée de 100mM (15 g/L),

entraîne une inhibition de la croissance et de la prolifération (Benavides *et al.*, 2007). Par opposé, la croissance des cellules DU-145 (cancer prostate) résiste à l'addition de méthionine exogène dans un premier temps et elle est inhibée uniquement quand la concentration de méthionine exogène dépasse 6.7 mM (1 g/L) (Benavides *et al.*, 2007). Les auteurs de ce travail ont conclu que l'action de la méthionine était liée à la signalisation p53 et que de façon concomitante à l'inhibition de la croissance, la méthionine réprimait l'expression de p53 native mais pas de p53 mutée. Plusieurs arguments allaient dans ce sens : 1) p53 est mutée dans les cellules DU-145 mais pas dans les cellules LNCaP ni MCF-7 ; 2) les siRNA anti-p53 entraînent l'augmentation de la croissance et de la prolifération des cellules LNCaP même si elles sont exposées à la méthionine ; 3) les concentrations élevées de méthionine réduisent l'expression de p53 native mais pas de p53 mutée. Des études ultérieures, tirant profit notamment d'analyses transcriptomiques sur microarray, ont montré que l'effet négatif sur la croissance exercé par la méthionine mettait en jeu une activation des mécanismes anti-oxydants et un ralentissement du cycle cellulaire dû à la sous-régulation de certaines familles de protéines kinases (Benavides *et al.*, 2014; Benavides *et al.*, 2010; Benavides *et al.*, 2011).

Un autre mécanisme qui pourrait expliquer pourquoi les concentrations élevées de méthionine inhibent la formation des cellules souches cancéreuses pourrait provenir du rôle d'effecteur métabolique exercé par la méthionine. En effet, l'excès de méthionine peut inhiber la croissance cellulaire en dérégulant le cycle de la méthionine (Finkelstein, 2007). L'excès de méthionine entraîne une élévation de la SAM, SAH et méthionine. La SAM est un inhibiteur allostérique de la MTHFR qui est la seule source de 5-méthyle tetrahydrofolate. La SAH et la méthionine inhibent la MTR. Ainsi l'excès de méthionine finit par créer un déficit en méthionine qui ralentit la croissance cellulaire. De même, la SAM, la SAH et la méthionine inhibent la BHMT qui catalyse la voie alternative de reméthylation de l'homocystéine en méthionine et, ce faisant, génèrent un déficit en méthionine endogène (Finkelstein *et al.*, 1974; Finkelstein and Martin, 1984; Ou *et al.*, 2007).

Enfin, nous avons examiné la corrélation entre transcriptome et méthylome (méthylation de l'ADN) en comparant les cellules souches cancéreuses et les cellules adhérentes monocouches. Il existe un degré élevé de corrélation (une augmentation significative de la transcription correspond à une diminution de la méthylation et inversement) pour les gènes

impliqués dans la définition du lignage neuronal (« neural stemness ») et les gènes impliqués dans le cycle cellulaire puisqu'une variation de méthylation du promoteur est notée dans près d'un quart des gènes dont la transcription change dans ces deux voies.

Par contre, un pourcentage de corrélation plus faible est observé dans le métabolisme des groupements monocarbonés. Parmi les 139 gènes testés (correspondant à une compilation de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport de la cobalamine et des folates, ainsi que des voies de sauvetage et des gènes fréquemment impliqués dans les déficiences en donneurs de méthyle), une corrélation négative est observée entre méthylome et transcriptome pour 16 gènes seulement. Une hyperméthylation du promoteur associée à une régulation négative du transcrite est observée pour 11 gènes. Il s'agit des gènes ATIC (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide qui code pour une protéine qui catalyse les 2 dernières étapes de la voie de synthèse des purines), GGH (gamma-glutamyl hydrolase qui catalyse l'hydrolyse du folylpoly-gamma-glutamates et antifolylpoly-gamma-glutamates et donne pteroyl-alpha-glutamate (acide folique) et glutamate), GOT1 (glutamic-oxaloacetic transaminase 1 enzyme cytoplasmique qui intervient dans la biosynthèse du L-glutamate à partir du L-aspartate ou L-cysteine), GOT2 (enzyme mitochondriale qui intervient dans le métabolisme des acides aminés et catalyse la transamination irréversible du métabolite du L-tryptophan le L-kynurenine pour donner de l'acide kynurenique (KA)), MAT2B (méthionine adenosyltransferase 2B qui code pour une protéine appartenant à la famille des méthionine adenosyltransferases (MAT). MAT catalyse la biosynthèse du S-adenosylmethionine à partir de la méthionine et de l'ATP, MTHFSD (méthényltetrahydrofolate synthetase), MTR (méthionine synthase), MTRR (méthionine synthase réductase), SHMT1 (sérine hydroxymethyltransferase 1), SMS (spermine synthase) et SPR (sepiapterin reductase 7,8-dihydrobiopterin, une NADP⁺ oxidoreductase importante dans la biosynthèse du 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin BH4). Une hypométhylation du promoteur associée à une régulation positive du transcrite est observée pour 5 gènes. Il s'agit de AMD1 (adenosylmethionine decarboxylase 1, qui code pour une importante enzyme intermédiaire de la synthèse des polyamines), DHFRL1 (dihydrofolate réductase like 1), GNMT (glycine N-méthyltransferase, dont le produit catalyse la conversion de S-adenosyl-L-méthionine (et de glycine) en S-adenosyl-L-homocystéine et sarcosine), MTFMT (mitochondrial méthionyl-tRNA formyltransferase) et MTHFR (méthylentetrahydrofolate reductase, codant pour une

enzyme catalysant la conversion du 5,10-méthylentetrahydrofolate en 5-méthyltetrahydrofolate, un co-substrat pour la reméthylation de l'homocysteine en méthionine).

Nos données suggèrent donc que la méthylation des promoteurs est un mécanisme qui explique partiellement la sous expression des gènes impliqués dans le cycle des folates observée dans les cellules souches cancéreuses méthionine dépendantes dérivées des cellules U251 de glioblastome.

En conclusion, nous montrons que les cellules souches cancéreuses (« tumor spheres ») dérivées des cellules U251 de glioblastome sont sensibles à la méthionine. Elles ne se développent pas en absence de méthionine mais leur croissance est ralentie en présence d'un excès de méthionine. Ce rôle ambivalent de la méthionine incite à mener des recherches supplémentaires pour définir son rôle éventuel dans le traitement des cancers. Ces « tumor spheres » peuvent être formées dans un milieu sans méthionine mais contenant du méthyle tetrahydrofolate. Les « tumor spheres » formées en présence de méthionine ou de méthyle tetrahydrofolate ne semblent pas avoir le même phénotype métabolique. La production des isoformes des folates est plus faible dans les « tumor spheres » formées en présence de méthyle tetrahydrofolate que dans celle formées en présence de méthionine. Il est envisageable de tester la capacité de réponse aux médicaments dans ces 2 types de « tumor spheres » afin de savoir si l'addition de méthyle tetrahydrofolate a un effet synergique qui génère une meilleure réponse au traitement. Le modèle 3D des « tumor spheres » reproduit la complexité d'une tumeur *in vivo* plus fidèlement que le modèle 2D qui consiste à faire pousser des cellules dans une flasque.

Les tests *in vitro* ont montré que dans les « tumor spheres » la production des isoformes des folates est diminuée. Le transcriptome a confirmé la diminution de la transcription des gènes impliqués dans le cycle des folates. Ces résultats doivent être vérifiés sur d'autres lignées cellulaires afin de déterminer si ce phénomène est limité aux cellules de glioblastome U251 ou s'il est général. Il faut aussi déterminer si les isoformes des folates pourraient constituer un biomarqueur du glioblastome en vérifiant si le cycle des folates est ralenti dans des tissus tumoraux extraits des patients.

Matériels et Méthodes

Fiche 1: Décongélation cellulaire

- Sortir le cryotube¹ de l'azote liquide
- Nettoyer l'extérieur du cryotube à l'alcool
- Transvaser le contenu du cryotube dans un tube de 15 mL contenant 10 mL de milieu de culture
- Centrifuger 5 min à 700 g pour l'élimination du glycérol ou du DMSO²
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 10 mL de milieu de culture
- Ensemencer une boîte de culture P100
- Changer le milieu après 24h

¹ Cryotube, Nalgène: VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

² DMSO (Dimethylsulfoxide): Gibco/Invitrogen; Cergy-Pontoise, France

Fiche 2 : Culture des monolayers

La lignée cellulaire utilisée est la lignée des glioblastomes humains U251³

Pour la culture des monolayers, elles sont maintenues dans du milieu F12⁴ supplémenté par 10% de sérum de veau foetal décomplémenté⁵, 100U/ml pénicilline⁶ et 100µg/ml de streptomycine⁷.

- Décongeler une ampoule de lignée cellulaire
- Introduire 10 mL du milieu complet dans une boîte de petri P100.
- Incuber à 37°C en atmosphère humide (5% CO₂ / 95% air)
- Changer le milieu tous les deux ou trois jours

Elles sont étudiées lorsqu'elles atteignent 80% de confluence. Des tests de mycoplasmes sont réalisés régulièrement.

³ U251 MG cell line human, 09063001 SIGMA

⁴ D6434 SIGMA, Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham

⁵ SVF, Sérum de veau foetal non décomplémenté: Eurobio Courtabœuf, France

⁶ Penicilline, GIBCO/Invitrogen

⁷ Streptomycine, GIBCO/Invitrogen

Fiche 3 : Culture des cellules souches

Préparation des boîtes coatées avec du méthacrylate⁸:

- Ajouter 0,2g de méthacrylate à 10mL d'éthanol 95%
- Incuber le mélange sous agitation à 65°C pendant quelques heures (2-4h) jusqu'à ce que le méthacrylate est entièrement dissolu.
- Appliquer ce mélange dans des plaques de cultures à 6 puits, en quantité suffisante pour couvrir le fond des puits (700 µL).
- Laisser les boîtes sécher pendant 48h à 37°

Le milieu de culture des cellules souches est composé de DMEM F12 + 1 X B27⁹ (50x), 0.2 µg/ml FGF¹⁰ (solution stock 0.1mg/ml), 0.2 µg/ml EGF¹¹ (solution stock 0.1mg/ml) + Pénicilline/Streptomycine 1%

- Trypsiner et centrifuger des cellules adhérentes
- Ensemencer 20 000 cellules dans chaque les puits d'une plaque 6 puits coatés avec du méthacrylate, avec 3ml de milieu.
- Ajouter 1 ml du milieu des cellules souches dans chaque puit chaque 2 jours.

⁸ Poly(2-hydroxymethyl methacrylate) Sigma Aldrich P3932

⁹ B27 supplement 50x serum free- Gibco/Thermofisher-17504044

¹⁰ FGF-Basic Recombinant Human Protein, PHG0026

¹¹ EGF Recombinant Human Protein, Thermofisher scientific, PHG0311

Fiche 4: Repiquage des monolayers

Tous les produits doivent être à température ambiante

- Eliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec du PBS¹² stérile
- Ajouter de la trypsine-EDTA¹³ 0,05% à raison de 40 µL par cm² à trypsiner
- Incuber 5 à 10 min à 37°C
- Préparer pendant ce temps un tube de 15 mL avec du milieu de culture correspondant à la lignée (2 fois le volume de trypsine)
- Décrocher les cellules à la pipette
- Resuspendre les cellules trypsinées dans le tube de 15 ml pour stopper la réaction
- Centrifuger à 700 g pendant 5 min
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 5 ml de milieu de culture correspondant au milieu dans lequel les cellules serontensemencées
- Le culot est repris dans du milieu, puis réensemencé dans de nouvelles boites.

¹² PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : GibcoInvitrogen, Cergy Pontoise, France

¹³ Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : GibcoInvitrogen, Cergy Pontoise, France

Fiche 5 : Repiquage des cellules souches

- Chaque 7 jours repiquer les cellules souches
- Centrifuger les cellules de chaque puit (5min, 300G)
- Eliminer Le surnageant
- Reprendre Le culot avec 0,5mL de trypsine et séparer les cellules des sphères par pipetage durant 1,5 minutes.
- Ajouter 3mL de milieu avec SVF (milieu des cellules adhérentes) et centrifuger de nouveau à 300G pendant 10 minutes.
- Eliminer le surnageant
- Reprendre Le culot dans 2 mL de milieu sans SVF (milieu des cellules souches), et remettre en culture dans un nouveau puits de plaque 6 puits coatés avec du méthacrylate.

Fiche 6 : Congélation des monolayers

- Préparer le milieu de congélation dans de la glace : 500 μL de DMSO, 9500 μL milieu complet.
- Après avoir trypsiné les cellules, centrifuger de nouveau et retirer le surnageant.
Déposer délicatement 1ml de milieu de congélation pour chaque 1 boîte de petri P100 en agitant légèrement le tube à 4°C
- Transférer les cellules ainsi suspendues dans un cryotube
- Placer les tubes dans la boîte de congélation¹⁴
- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans un container à azote liquide
- Référencer les tubes congelés et décongelés dans les registres de cultures cellulaires.

¹⁴ Boîte de congélation: NalgèneCryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France) dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive

Fiche 7 : Marquage immunocytochimie

Principe : Le but de l'IHC est la mise en évidence d'antigènes sur une coupe de matériel de tissu qu'il soit préalablement fixé ou congelé. L'antigène est d'abord reconnu par un anticorps primaire spécifique, celui-ci étant secondairement révélé par un montage variable dont le marquage peut se faire soit par réaction colorimétrique soit par un marqueur fluorescent.

Au sein du laboratoire d'Anatomie pathologique du CHRU Hôpital Central de Nancy, le système d'amplification et de révélation utilisé est celui de la technique « Flex+ lapin » EnVision™ FLEX (Dako, Carpinteria, CA, USA). Cette technique utilise un kit commercialisé par Dako et est réalisée sur l'automate Autosteiner Plus Link® Dako. Ce système permet une amplification du signal de 2 à 3 fois par rapport à une technique streptavidine-biotine standard et permet d'éviter un signal non spécifique généré par les biotines endogènes. Schématiquement l'antigène est détecté par un anticorps primaire de lapin. Celui-ci se lie à un anticorps secondaire anti-lapin. Ce dernier se fixe à un polymère composé d'un dextrane lié à des anticorps de chèvre se fixant aux immunoglobulines de lapin et à de multiples molécules de peroxydase. Le montage est ensuite révélé par un système chromogène-substrat avec l'ajout de peroxyde d'hydrogène et de diaminobenzidine (DAB).

Fixation, inclusion et coupe :

- Fixer les tissus dans du formaline 10% et les inclure dans du paraffine. Les cellules sont fixées avec un gel histologique (thermoscientifique)
- Couper les tissus et les cellules fixées en coupes épaisses de 3µM
- Monter les tissus à l'eau sur des lames Polysine™ (LABONORD S.A., Templemars, FR), séchées pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis placées à l'étuve à 56°C pendant 1 à 2 heures

Prétraitement :

- Le déparaffinage et le démasquage des sites antigéniques sont réalisés dans le même temps dans un bain-marie PLink™ DAKO en tampon citrate pH 6,0 pendant 20 min.

Dilution des anticorps :

- Dilués les anticorps primaires dans le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM 830) soit un tampon Tris, pH 7,2, Na₃N 15mmol/L.

Technique Flex+ lapin sur automate Autosteiner Plus Link® Dako :

- Rincer les lames avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 ($\pm 0,1$) pendant 5 min
- Bloquer des peroxydes endogènes avec le réactif EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (SM 801) soit un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN₃ 15mmol/L et un détergent pendant 5 min
- Laver 2 fois, 5min
- Incuber avec l'anticorps primaire pendant 1h
- Laver 2 fois, 5min
- Ajouter l'anticorps secondaire avec EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (SM 805) soit une solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien pendant 15 min
- Laver 2 fois, 5min
- Déposer un polymère marqué avec EnVision™ FLEX/HRP (SM802) soit un dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules secondaires de l'espèce concerné dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur pendant 20 min
- Laver 2 fois, 5min
- Révéler le système par un chromogène-substrat avec EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM 803) soit une solution tamponnée diluant une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et le chromogène diaminobenzidine (DAB) et un agent conservateur pendant 10 min
- Laver 2 fois, 5min
- Réaliser la contre-coloration avec EnVision™ FLEX Hematoxylin (SM 806) soit une solution aqueuse d'hématoxyline pendant 5 min
- Les derniers rinçages sont réalisés avec le tampon Tris et l'eau distillée

Montage des lames :

- Déshydrater les lames dans des bains successifs d'éthanol absolu, d'éthanol 96° et toluène, pendant 5 min chacun
- Réaliser le montage à l'Eukitt® (LABONORD S.A., Templemars, FR)

	Anticorps anti-	Source	Fournisseur
Anticorps primaires	CARM1	Lapin	Millipore
	Ki-67	Souris	Dako
	MCM6	Lapin	Dako
	MTR	Lapin	Abcam
	DHFR	Lapin	Abcam
	SHMT1	Lapin	Sigma
	MTHFD1	Lapin	Sigma
	MTHFD2	Souris	Abcam

Fiche 8 : Extraction d'ARN

Lyse et homogénéisation de l'échantillon

- Trypsiner et récupérer les cellules des plaques
- Dans des microtubes type SafeLock ou SafeSeal de 1.5 mL, ajouter 1 mL de TRIzol
- Homogénéiser avec une micropipette.

Procéder à la séparation de phase ou stocker l'échantillon homogénéisé à -80°C (> 6 mois)

Séparation des phases

- Incuber l'échantillon homogénéisé 5 min à température ambiante (dissociation des complexes nucléoprotéiques).
- Centrifuger les tubes Phase Lock Gel (PLG) à 12 000g dans une micro-centrifugeuse pendant 30 à 60s.
- Transférer l'échantillon lysé dans le tube PLG centrifugé.
- Ajouter 0.2 mL de chloroforme pour 1 mL de TRIzol (bien vérifier que les tubes sont fermés).
- Agiter vigoureusement à la main pendant 15 secondes.
- Incuber 3 minutes à température ambiante.
- Centrifuger les échantillons à 12,000 g/4°C/15 min.

Note : Le mélange est séparé en 2 parties : une phase inférieure contenant le Phénol/chloroforme et les ADN, séparée par le gel de la phase supérieure aqueuse incolore contenant l'ARN.

- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau microtube type SafeLock ou SafeSeal de 1.5 mL.

Note : Il est possible de réeffectuer une séparation en ajoutant à nouveau du chloroforme dans le tube PLG puis de le centrifuger.

Précipitation de l'ARN

- Ajouter 1 µL du glycoblue.
- Ajouter 0.5 mL d'isopropanol 100% (=alcool isopropylique = propanol-2) à la phase aqueuse pour 1 mL de TRIzol utilisé.
- Incuber 10 min à température ambiante, agiter doucement à la main régulièrement.
- Centrifuger à 12,000 g/4°C/10 min.

Note : L'ARN est souvent invisible avant la centrifugation, ensuite il forme un culot sur le côté au fond du tube après la centrifugation.

Lavage de l'ARN

- Retirer le surnageant du tube sans toucher le culot d'ARN.
- Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 80% pour 1 mL de TRIzol utilisé.

Note : L'ARN peut être stocké dans l'éthanol 75% au moins 1 semaine à 4°C ou plus d'un an à -20°C.

- Agiter l'échantillon brièvement et centrifuger le tube à 7,500 g/4°C/5 min. Eliminer le surnageant.

Note : il est possible d'effectuer un deuxième lavage à l'éthanol 75%, pour cela répéter les étapes 17 et 18.

- Sécher le culot à l'air libre pendant 5–10 minutes : tube retourné sur un papier absorbant.

Note: Ne pas sécher complètement au risque de rendre l'ARN insoluble. Les ARN partiellement solubilisés ont un ratio A260/280 <1.6.

- Reprendre l'ARN dans le tampon souhaité (eau RNase-Free)..
- Conserver les ARN à -80°C.

Fiche 9 : Quantification des ARN

- Diluer les échantillons d'ARN dans de l'eau Milli-Q à un 1/120ème dans une cuve en quartz
- Lire l'absorbance à 260 et 280 nm avec un spectrophotomètre.
- Une concentration d'ARN de 40 µg/mL donne une absorbance d'environ une unité de DO.
- La concentration en ARN est calculée selon la formule suivante :
$$[\text{ARN}] = 44 \mu\text{g/mL} \times A_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution.}$$
- Le ratio A_{260} / A_{280} est également calculé pour vérifier la pureté de la solution. Celui-ci doit être compris entre 1,8 et 2. Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN.
- Faire des aliquotes de 1 µg d'ARN pour faire la transcription inverse

Fiche 10: Vérification de qualité des ARN avec le Bioanalyseur Agilent

Le Bioanalyzer 2100 (Agilent) est une plateforme qui permet de séparer des échantillons par électrophorèse en vue de leur contrôle-qualité.

Ref Kit: 5065-4476 <http://www.chem.agilent.com>

Réactifs et matériels :

- Bioanalyseur 2100 Agilent
- RNA 6000 Nano Kit
- RNA 6000 Nano Chips
- Chip priming station
- Echantillons à doser (12 échantillons/puce)
- RNA 6000 ladder (Stocké à -80 °C, aliquotes de 1.5ul/tube)
- La concentration requise pour les échantillons requise doit être comprise entre 5 et 500ng/μL

Préparation du « ladder »

- A réception du kit, le « ladder » peut être conservé à -20 °C jusqu'à sa préparation. Pour préparer le « ladder », le décongeler et le dénaturer 2 min à 70 °C puis le placer immédiatement sur glace. Faire des aliquots de 1,5 μL dans des tubes eppendorf de 0,5 mL. Les aliquots sont conservés à -80°C.

Préparation du matériel

- Sortir le RNA 6000 Nano Assay Kit à température ambiante, 30 min avant utilisation, à l'abri de la lumière.
- Préparer un incubateur (tubes eppendorf de 0.5ml) à 70 °C.
- Préparer la station

Préparation du Gel-dye Mix

RNA gel matrix filtré

- Placer 550 μL de RNA gel matrix sur la colonne de filtration. Centrifuger 10 min à 4000 rpm (1500 rcf). Conserver un mois à 4 °C.
- **Gel-dye mix**
- Mettre 65 μL de RNA gel matrix filtré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et rajouter 1 μL de RNA dye concentré → Vortexer, Centrifuger 10 min à 12 000rpm (13 000 rcf)
Gel-dye mix conservation 2 jours à 4 °C, à l'abri de la lumière

Préparation des échantillons et du marqueur de taille

- Décongeler le RNA 6000 Ladder sur glace.
- Incubation des échantillons et du ladder (optionnel pour le ladder), 2 min à 70 °C, pour les dénaturer.
- Placer immédiatement les tubes sur glace. Les centrifuger (les conserver sur la glace).

Couler le gel

- Placer la seringue sur « La station ».
- Régler la seringue sur 1 mL.
- Déposer 9 µL de Gel-dye mix dans le puits G de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !)
- Placer la puce dans « La station ».
- Fermer « La station » en presser doucement sur la seringue jusqu'au « clip ». Attendre exactement 30 secondes
- Déclipser la seringue. Laisser la position de la seringue remonter doucement (jusqu'à la graduation 0,8 mL environ), remonter doucement le piston de la seringue à 1 mL.
- Ouvrir « La station ».

Puce

- Déposer 9 µL de Gel-dye mix dans les deux puits notés G de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !).
- Vortexer le RNA 6000 Nano marker.
- Déposer 5 µL de RNA 6000 Nano marker dans le puit réservé au ladder et dans les 12 puits réservés aux échantillons.
- Déposer 1 µL de ladder (L décongelé) dans son puits
- Déposer 1 µL de chaque échantillon.
- Vortexer 1 min la puce à 2400 rpm.
- Placer la puce dans l'appareil Agilent 2100 bioanalyzer.

Fermer le couvercle de l'appareil doucement pour ne pas endommager les électrodes

Démarrer l'analyse dans un délai maximum de 5 min

Analyse (logiciel version B)

- Allumer le périphérique puis l'ordinateur, se connecter grâce au « login » et au « mot de passe » relatif au projet qui ont été fournis par la plateforme.

- Dans le menu Previous Assay, sélectionner RNA.
- Sélectionner Eucaryote Total RNA Nano pour le contrôle d'ARN total (ou mRNA).
- Appuyer sur START.

Lorsque l'analyse commence, penser à nommer les échantillons.

Nettoyage des électrodes de l'appareil

- Déposer 350 µL de RNase ZAP dans une puce de lavage RNase ZAP. L'introduire dans l'appareil, et la laisser 1 minute (pas plus).
- Déposer 350 µL d'eau dans la puce prévue à cet effet. L'introduire dans l'appareil, et la laisser 1 minute.
- Laisser le couvercle de l'appareil ouvert durant 1 minute pour sécher les électrodes puis le refermer.

Sauvegarde des données et impression

- Pour imprimer les données, cliquer sur l'icône d'impression.
- Décocher PDF et/ou HTML puis appuyer sur « print »
- Pour sauvegarder les données.
- Cocher PDF puis « save as » sur le support le plus approprié (clé USB, serveur, mes documents)

Fiche 11 : Extraction d'ADN (kit Machery Nagel)

- Resuspendre les cellules dans un volume de 80 µL de Buffer T1. + 80 µL T1
- Ajouter 8 µL Proteinase K et vortexer 2 x 5 s.
- Incuber 10 min à 56 °C.
- Ajouter 80 µL Buffer B3 et vortex 2 x 5 s
- Incuber 5 min à 70 °C.
- Laisser la solution refroidir un peu à température ambiante
- Ajouter 80 µL ethanol (96–100 %) et vortexer 2 x 5 s.
- Pour chaque échantillon ajouter une colonne NucleoSpin® Tissue XS Column dans le Collection Tube (2 mL).
- Ajouter la solution dans la colonne
- Centrifuger pour 1 min à 11,000 g.
- Enlever le surnageant et mettre la colonne dans un nouveau Collection Tube (2 mL).
- Laver la colonne en ajoutant 50 µL Buffer B5.
- Centrifuger pour 1 min à 11,000 g
- Faire un 2ème lavage en réajoutant 50 µL Buffer B5
- Centrifuger pour 2 min à 11,000 x g.
- Enlever le surnageant
- Mettre la colonne dans un tube eppendorf et ajouter 20 µL de l'eau RNase DNase free
- Centrifuger pour 1 min à 11,000 x g.
- Récupérer l'ADN

Fiche 12 : Expression génique – qRT-PCR SYBR Green

Expression des gènes qRT-PCR SYBR Green

La rétrotranscription des ARN totaux est réalisée avec le Quantitect® Reverse Transcription Kit de Qiagen.

L'élimination d'ADN génomique est réalisée par un mix content 1µg d'ARN, 2µL de gDNA Wipeout®, qsp 12µL avec de l'eau RNase-free, homogénéisé et centrifugé puis soumis à un programme d'incubation de 9min à 42°C suivi d'1min sur glace 6µL de mix de RT sont ajoutés, contenant de 4µL de Quantiscript RT 5x, 1µL de RT primer mix et 1µL d'enzyme Quantiscript RT, homogénéisés et centrifugés
Deux tubes contrôles sont réalisés:

- Contrôle négatif (RT sans ARN), 14 µL d'H₂O au lieu de 14 µL d'ARN
- Contrôle positif (RT sans enzyme), 1µL H₂O au lieu de 1 µL de Quantiscript RT

Le programme de RT comporte une phase de 15min à 42°C suivi de 3min à 95°C

- Quantitect™ SYBR® Green PCR

1µL d'ADNc est déposé dans chaque puit

Le mix est réalisé à partir de 10µL SYBR Green PCR 2X, 1µL de chacune des sondes sens et anti-sens à 10µM, 8µL d'eau RNase-free pour un volume total de 20µL de mix par réaction

Les 20µL sont ajoutés dans chaque puit contenant les amorces des gènes puis la plaque est fermée par un film adhésif transparent

La plaque est centrifugée 1min à 1000g pour éliminer les bulles d'air

Le programme de PCR comporte une activation de la polymérase de 15min à 95°C suivi de 40 cycles d'une succession 10sec à 94°C / 15sec à X°C / 15sec à 72°C (X : température dépendante du couple d'amorce). Une étape d'élongation finale de 7min à 72°C suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5sec permet d'obtenir les melting curves

Selon l'appareil utilisé, l'analyse est réalisée sur le logiciel « RelQuant » (Roche) ou le « Step One Plus Software » (Applied biosystems)

Fiche 13 : les amorces utilisées en PCR quantitative

Couples d'amorces ¹⁵	Séquences
NANOG	S : 5'-ATGCCTCACACGGAGACTGT-3' AS : 5'-AGGGCTGTCCTGAATAAGCA-3'
SOX2	S : 5'-GAAAAACGAGGGAAATGGG-3' AS : 5'GCTGTCATTTGCTGTGGGT-3'
OCT4	S : 5'-AACGACCATCTGCCGCT-3' AS : 5'CGATACTGGTTCGCTTTCTCT-3'
CARM1	S : 5'-CCAGTTTTATGGCTACCTGTCC-3' AS : 5'-TTGAAGTCGGTGTGGTTTTG-3'
PRMT1	S : 5'-GTCATCGGGATCGAGTGTTCC-3' AS : 5'-TCCACCTTCCCCTTGATGAT-3'
MTR	S : 5'-TGTGGAGACTCGCAGACATC-3' AS : 5'-CCTCAACCTGATCCTTGGAA-3'
MTRR	S : 5'-TGGAGCCCGGCATTTCTATG-3' AS : 5'-AGTGCGCCACTTATCTCCTCT-3'
TBP	S : 5'-TTGGGTTTTCCAGCTAAGTTCT-3' AS : 5'CCAGGAAATAACTCTGGCTCA-3'
RPL13a	S : 5'-CAAGCGGATGAACACCAAC-3' AS : 5'-TGTGGGGCAGCATACCTC-3'
HMBS	S : 5'-TGTGGTGGGAACCAGCTC-3' AS : 5'-TGTTGAGGTTTCCCCGAAT-3'

¹⁵ Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Les Ulis, France). Les amorces pour la PCR quantitative ont été purifiées par HPLC. Les oligonucléotides utilisés ont été choisis à l'aide du logiciel Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse Internet, <http://www.genome.wi.mit.edu>

Fiche 14 : Marquage immunofluorescent sur cellules monolayers

Préparation pour marquage immunocytochimique

- Mettre les lamelles dans les puits (p24 → 24puits)
- Ajouter 1ml de poly-lysine (1/1000 dans eau stérile)
- Incuber au minimum 2h et au maximum 24h à 37°C
- Retirer la poly-lysine
- Laver 3 fois avec du PBS 1X
- Ensemencer les lamelles en ajoutant 250 000 cellules par puits et incuber 2 nuits à 37°C (si incubation 1 nuit → $3 \cdot 10^5$ cellules)
- Rincer 2 fois 5min avec du PBS
- Fixer les cellules 10min avec une solution de para-formaldéhyde (PAF) à 4% (20g dans 450µl eau distillée + 50ml PBS 1X)
- Rincer 2 fois 5min avec du PBS
- Soit réaliser le marquage immunocytochimique soit conserver
- → Pour conservation :
- Remplir les puits avec de l'eau distillée
- Conserver à 4°C (maximum 1mois)

Perméabilisation des membranes

- 2x10 min Triton 0.1%
- Lavage PBS, 3x5 min (sous agitation)

Blocage

- PBS/BSA1%, 1h à température ambiante sous agitation lente
- Lavage PBS, 1x5 min (sous agitation)

Anticorps I^{aire} (faire un témoin Ab-)

- Diluer les anticorps dans la solution de blocage au 1/200
- Incuber toute une nuit à 4°C sous agitation lente
- Lavage Triton 0.1%, 3x5 min (sous agitation)

Anticorps II^{aire} (dans l'obscurité)

- Diluer les anticorps dans la solution de blocage au 1/1000
- Incuber 1h, RT en chambre humide sous agitation lente
- Lavage PBS, 3x5 min (sous agitation)

Coloration des noyaux :

- Diluer la solution de DAPI au 1/3000 dans H₂O milliQ
- Ajouter 100-150 µL /coupe, incuber 5 min, RT
- Rincer à l'eau milliQ

Montage des lames

- Ajouter une goutte de fluoromount sur chaque coupe
- Couvrir avec une lamelle (éviter les bulles d'air)
- Laisser sécher dans une cassette dédiée ~24h à 4°C

Fiche 15 : Marquage immunofluorescent sur cellules souches

- Transférer les cellules en suspension de chaque puit vers un tube eppendorf et centrifuger 3min à 800 rcf
- Resuspendre les cellules dans 1 ml PBS et centrifuger 3min à 800 rcf
- Resuspendre les cellules dans 160 µL PBS
- Ajouter 20 µL 4% PAF, vortexer et incuber à température ambiante pour 15 min
- Centrifuger 3min à 800 rcf et aspirer la solution de PAF
- Resuspendre les cellules dans 1 ml PBS et centrifuger 3min à 800 rcf (répéter 2fois)
- Perméabiliser les cellules avec une solution de 0.3% triton X-100 dans du PBS
- Transférer les échantillons dans un nouveau tube eppendorf et centrifuger 3min à 800 rcf
- Laver le culot avec 500 µL PBS + 0.1% Tween-20 et centrifuge 3min à 800 rcf
- Bloquer les cellules dans une solution de BSA 3% +0.1% tween-20 pour 1 heure à température ambiante
- Centrifuger 3min à 800 rcf et enlever le surnageant
- Ajouter l'anticorps primaire selon la dilution (1/200) pendant la nuit à 4 C
- Centrifuger 3min à 800 rcf et aspirer la solution primaire
- Laver le culot avec 500 µL PBS + 0.1% Tween-20 et centrifuge 3min à 800 rcf (répéter 2 fois)
- Ajouter l'anticorps secondaire selon sa dilution pour 1 h à température ambiante
- Centrifuger 3min à 800 rcf et enlever le surnageant
- Laver le culot avec 500 µL PBS + 0.1% Tween-20 et centrifuge 3min à 800 rcf (répéter 2 fois)
- Ajouter 0.5 ng/ml DAPI dans du PBS pour 5 min
- Centrifuger 3min à 800 rcf et enlever le surnageant
- Laver le culot avec 500 µL PBS + 0.1% Tween-20 et centrifuge 3min à 800 rcf (répéter 2 fois)
- Centrifuger 3min à 800 rcf et enlever le surnageant
- Resuspendre le culot dans de fluoromount et l'étaler sur une lame
- Couvrir avec une lamelle (éviter les bulles d'air)
- Laisser sécher dans une cassette dédiée ~24h à 4°C

Fiche 16 : Préparation des bibliothèques pour RNAseq

Après l'extraction de l'ARN (5µg) et la vérification de la qualité des ARN au bioanalyseur (RIN>8) nous procédons à la préparation des bibliothèques pour RNAseq

Étape 1: **BaseLine-Zero DNase**

Resuspendre le mix d'acide nucléique dans 17 µL d'eau RNase-free

Ajouter 2µL de 10x tampon Baseline-Zero DNase

Ajouter 1µL de Baseline-Zero DNase

Laisser 25 min à 37°C

Inactiver Baseline Zero DNase par une extraction avec du phénol chloroforme et une précipitation par du sel/éthanol.

Étape 2: **procédure RiboZero**

Lavage des billes:

Ajouter 225µL de billes magnétiques pour chaque échantillon

Laisser sur un portoir magnétique pour 1 min jusqu'à ce que le liquide devienne clair

Jeter le surnageant

Laver en ajoutant 225µL d'eau RNase free puis en vortexant et remettant les tubes sur le portoir magnétique jusqu'à ce que le liquide redevienne clair. (Répéter 2 fois)

Jeter le surnageant

Enlever du portoir magnétique

Ajouter 60µL d'une solution de resuspension de bille magnétique

Vortexer, Ajouter 65µL de billes magnétiques pour chaque échantillon

Ajouter 1 µL RiboGuard RNase inhibiteur pour chaque tube. Vortexer

Laisser à température ambiante

Hybridation des sondes

Pour chaque échantillon ajouter:

4µL tampon RiboZero

26µL RNA

10µ solution qui enlève Ribo-Zero

Mettre dans un thermocycleur à 68°C pour 10 min

Centrifuger un peu

Laisser à température ambiante pour 5 min

Enlever rRNA

Ajouter 40µL RNA dans un tube contenant 65µL billes magnétiques lavées

Vortexer pour 10 sec et laisser à température ambiante

Mettre dans un thermocycleur à 50°C pour 5 min

Mettre sur un portoir magnétique jusqu'à ce que le liquid redevienne clair

Transférer le surnageant contenant RNA dans un nouveau tube de 1,5ml

Mettre sur glace

Purification RNA (RNeasy MinElute Cleanup Kit)

Ajouter eau RNase free jusqu'à qsp 100µL

Ajouter 350µL tampon RLT

Ajouter 550µL 96%-100% ethanol

Ajouter la moitié du mix (~500µL) dans une colonne RNeasy MinElute placée dans un tube de collection de 2 ml

Centrifuger à 8000g pour 15 sec

Prendre le tube de collection

Ajouter 500µL tampon RPE

Centrifuger à 8000g pour 15 sec

Prendre le tube de collection

Ajouter 500 µL 80% ethanol sur la colonne

Centrifuger 8000g pour 2 min

Prendre la colonne et la mettre dans un nouveau tube de 2ml

Centrifuger avec une vitesse maximale pour 5 min.

Ajouter la colonne dans un nouveau tube de 1,5ml

Ajouter de l'eau RNase free dans le milieu de la colonne et centrifuger pour 1 min

Etape 3: Préparation des bibliothèques pour ScriptSeq v2 RNA seq

Fragmentation de l'ARN

Mélanger:

Eau nuclease free

RNA traiter avec du RiboZero

Solution de fragmentation d'ARN

Amorces cDNA

Incuber dans un thermocycleur à 85°C pour 5min

Mettre sur la glace

Synthèse cDNA

Mélanger:

cDNA synthesis Premix

100mM DTT

StarScript AMV reverse transcriptase

Ajouter cDNA synthesis Master Mix

Incuber à 25°C pour 5 min ensuite à 42°C pour 20min

Mettre à 37°C

Ajouter Finishing solution

Incuber à 37°C pour 10min

Incuber à 95°C pour 3min

Mettre à 25°C

Synthèse 3'tagged ADN

Mélanger:

Terminal tagging premix

DNA polymerase

Ajouter Terminal Tagging Master Mix

Incuber pendant 15min à 25°C

Incuber pendant 3 min à 95°C

Laisser à 4°C

Purification cDNA

Choisir Agencourt AMPure purification. Eluer dans 225µL

Amplification par PCR

Mélanger dans un tube de PCR:

25µl FailSafe PCR Premix E

1µl Forward PCR primer

1µl Reverse PCR primer

22.5µl di-tagged cDNA

0.5µl Failsafe PCR enzyme

Condition de PCR

Denaturation 95°C 1min

10-15cycle:

95°C 30sec

55°C 30sec

68°C 3min

Incuber à 68°C pour 7min

Purification des librairies

AMPure purification

Fiche 17 : Méthylome

Un échantillon de 1 µg d'ADN est traité avec le kit de Zymo research pour la bisulfitation :

- Ajouter 5 µl de M-Dilution Buffer à l'échantillon d'ADN et ajuster le volume total à 50 µl avec de l'eau. Mélangez l'échantillon en cliquant ou en pipetant vers le haut et vers le bas.
- Incuber l'échantillon à 37 ° C pendant 15 minutes.
- Après l'incubation ci-dessus, ajouter 100 µl du réactif de conversion CT préparé à chaque échantillon et mélanger.
- Incuber l'échantillon dans l'obscurité à 50 ° C pendant 12 à 16 heures.
- Incuber l'échantillon à 0-4 ° C pendant 10 minutes.
- Ajoutez 400 µl de M-Binding Buffer à une colonne IC Zymo-Spin™ et placez la colonne dans un tube de collecte fourni.
- Chargez l'échantillon (de l'étape 5) dans la colonne IC Zymo-Spin™ contenant le tampon de liaison M. Fermez le capuchon et mélangez en inversant la colonne plusieurs fois.
- Centrifuger à pleine vitesse ($\geq 10,000 \times g$) pendant 30 secondes. Jeter l'écoulement.
- Ajouter 100 µl de M-Wash Buffer à la colonne. Centrifugez à pleine vitesse pendant 30 secondes.
- Ajouter 200 µl de M-Desulfonation Buffer dans la colonne et laisser reposer à température ambiante (20 à 30 ° C) pendant 15 à 20 minutes. Après l'incubation, centrifuger à pleine vitesse pendant 30 secondes.
- Ajouter 200 µl de M-Wash Buffer à la colonne. Centrifugez à pleine vitesse pendant 30 secondes. Ajouter un autre 200 µl de M-Wash Buffer et centrifuger pendant 30 secondes supplémentaires.
- Placez la colonne dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml. Ajouter 10 µl de M-Elution Buffer directement dans la matrice de la colonne. Centrifugez pendant 30 secondes à pleine vitesse pour éluer l'ADN.

- L'ADN est prêt pour une analyse immédiate ou peut être stocké à une température inférieure ou égale à -20°C pour une utilisation ultérieure. Pour un stockage à long terme, conserver à ou au-dessous de -70°C . Nous recommandons d'utiliser 1,4 μl d'ADN élue pour chaque PCR, mais jusqu'à 10 μl peut être utilisé si nécessaire. Le volume d'élution peut être $<10\ \mu\text{l}$ selon les besoins de vos expériences, mais de petits volumes d'élution produiront un ADN plus concentré.

600 ng d'ADN bisulfuté est traité avec le 450K Human Methylation Illumina. L'expérimentation a été faite suivant le protocole de la plateforme Analyses bioinformatiques

Fiche 18 : Analyses bioinformatiques

Ces analyses ont été réalisées par l'ingénieur bioinformaticien du laboratoire, le Dr. Hergalant :

Analyses du transcriptome par RNA-seq

L'intégralité des traitements préalables à l'étude du transcriptome est exposée en détail ci-dessous, et suit un pipeline d'analyse schématisé sur la figure 55.

Au sortir de la plateforme de séquençage, les données brutes « paired end » correspondant à des fragments (« reads ») de 100 nucléotides ont été compilées dans des fichiers FASTQ répondant au format standard.

Le contrôle qualité des séquences nucléotidiques a été effectué en utilisant FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Les adaptateurs génériques Illumina Truseq ont été enlevés avec cutadapt v1.11 (Martin, 2011), en éliminant les « reads » inférieurs à 30 nucléotides, avec les paramètres « -a AGATCGGAAGAG -A AGATCGGAAGAG -m 30 -non-indels -O 5 ».

L'alignement des « reads » et le filtrage principal ont été effectués à l'aide de HISAT2 v2.0.4 - (Kim *et al.*, 2015) un outil qui prend en compte et permet la découverte des sites donneurs et accepteurs d'épissage - en se référant au génome version hg38 comme décrit ci-dessous, avec un indice de référence construit pour tenir compte des SNP ainsi que des transcrits connus et approuvés. Un tel index peut être téléchargé sur ftp://ftp.ccb.jhu.edu/pub/infphilo/hisat2/data/grch38_snp_tran.tar.gz. Seuls les « reads » correctement appariés avec un alignement unique ont été retenus, en appliquant des contraintes supplémentaires pour attribuer les scores : « --score-min L, 0, -0,2 --sp 10,3 - non-unal --dta - non mixed ». Samtools v1.3.1 (Li *et al.*, 2009) a été utilisé pour traiter les fichiers d'alignement tout au long de l'analyse. Les duplicats de PCR ont été détectés avec Picard v1.13 MarkDuplicates (<https://broadinstitute.github.io/picard/>).

Les transcrits à épissage différentiel ont été assemblés à partir des alignements obtenus avec Stringtie v1.3.3b (Pertea *et al.*, 2015). Cette méthode est inspirée du « workflow » proposé pour identifier les nouveaux isoformes et les isoformes déjà connus à partir du génome de référence (<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/index.shtml?t=manual>), en utilisant comme guide un fichier d'annotation pour hg38 au format gtf (voir les détails ci-dessous). Le processus se déroule en différentes étapes successives, et les paramètres suivants ont été appliqués : la première étape concerne chaque échantillon individuellement, avec « -f 0.2 -j 3

-c 10 -M 0.5»; La deuxième étape fusionne tous les transcrits de tous les échantillons, «--merge -m 200»; et la dernière étape estime l'abondance et la couverture de lecture pour tous les transcrits fusionnées, pour chaque échantillon «-A -C -f 0.2 -j 3 -c 10 -M 0.5». Deux tableaux ont été générés à partir de ces résultats, un avec les « reads » bruts au niveau du gène et un autre au niveau des transcrits. Quand cela est possible, les deux fichiers ont été annotés avec des symboles de gènes officiels (HGNC ou HUGO Gene Nomenclature Committee, <https://www.genenames.org/>) correspondants aux emplacements génomiques des gènes et des transcrits.

Les tableaux de comptages bruts ont été filtrés en appliquant un seuil d'expression minimum pour un gène ou un transcrit. Ceux-ci doivent être exprimés (valeur non nulle) dans au moins deux échantillons et présenter une valeur d'expression moyenne dans tous les échantillons supérieurs à 1 / 10 000 000 de la taille moyenne de la bibliothèque. Les données ont été ajustées plus précisément avec la méthode de normalisation TMM (trimmed means of M-values) (Robinson and Oshlack, 2010) et ensuite transformées selon log₂- (logarithme base 2) et cpm- (comptes par million), pour suivre les bonnes pratiques de calibration et d'estimation des expressions différentielles, comme décrit précédemment (Law *et al.*, 2014)

Analyses transcriptomiques

Les p-values d'expression différentielle ont été obtenues en appliquant un test de Student bi-directionnel modéré (la variance est calculée sur tous les échantillons disponibles et pas uniquement les groupes testés) et ajusté pour tenir compte des faux positifs (FDR pour false discovery rate) suivant la procédure de Benjamini-Hochberg.

Toutes les classifications hiérarchiques ont été réalisées avec Cluster 3.0 (de Hoon *et al.*, 2004) sur des valeurs centrées sur la médiane des échantillons, en utilisant la corrélation de Pearson non centrée comme distance métrique de similarité. Les dendrogrammes ("heatmaps") correspondants ont été obtenus avec une version personnalisée de Slcview dérivée de la dernière version 1.1.2 (<http://slcview.sourceforge.net/>). Pour les classifications ciblées, les ensembles de gènes ont été téléchargés à partir de MSigDB (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>), section C2, et recherchés à partir des ensembles/listes KEGG, BioCarta ou REACTOME.

Les annotations fonctionnelles ont été effectuées en utilisant Gene Ontology (GO) (Ashburner *et al.*, 2000) et GoMiner (Zeeberg *et al.*, 2003) sur les ensembles de gènes

sélectionnés (par classification hiérarchique, recherches de DMRs, etc...). L'enrichissement des termes GO a été déterminé comme suit : Enrichissement = fréquence du terme GO dans la sélection de gènes/ fréquence du terme GO dans l'ensemble complet des gènes exprimés. Les FDR résultants ont été calculés par « bootstrapping » des p-values obtenues (50 fois), avec un seuil à 0.01 minimum pour retenir une annotation comme significative.

Les analyses des voies cellulaires et métaboliques disponibles sur KEGG (www.genome.jp/kegg/pathway.html) ont été effectuées à l'aide de la bibliothèque GAGE (Generally Applicable Gene-set Enrichment for Pathway Analysis) (Luo *et al.*, 2009) sous R. Le rendu visuel des voies les plus significatives / perturbées a été réalisé à l'aide du programme R Pathview (Luo and Brouwer, 2013) avec un ensemble de gènes significatifs (valeur p < 0.01) et leurs fold-changes correspondants (FC > 1 : rouge, sur-exprimé ; FC < 1 : vert, sous-exprimé).

Analyses du méthylome

Les données brutes correspondant aux canaux méthylés / non méthylés ont été extraites des fichiers idat Illumina, normalisées selon la procédure FuncNorm (Fortin *et al.*, 2014) et transformées en B-values (valeurs bêta de méthylation représentant une réalité biologique sous forme de pourcentage de cellules méthylées pour une sonde donnée, variant de 0 pour une absence de méthylation à 1 si la sonde est méthylée sur toutes les cellules étudiées) en utilisant le package R minfi (Aryee *et al.*, 2014). Ces B-values ont été utilisées pour l'interprétation directe et la représentation graphique, tandis que les M-values (représentation plus proche de la réalité mathématique, centrée sur 0) ont été utilisées pour les statistiques et les calculs. Les sondes ont ensuite été filtrées en fonction de leurs positions relatives à partir de SNP connus (ce qui biaise la mesure de méthylation). Pour ce faire, la fonction rmSNPandCH du programme R DMRcate a été utilisée, avec comme paramètres principaux : dist = 3, mafcut = 0.05, rmcrosshyb = TRUE. Sur les 485 512 sondes non filtrées de la puce Illumina Infinium 450k de départ, 435 786 sondes ont été validées pour la suite des analyses.

Pour chaque sonde, la méthylation différentielle et sa significativité statistique ont été évaluées par des méthodes bayésiennes empiriques après modélisation linéaire des groupes d'échantillons. Ces méthodes sont fournies par le package R limma (Ritchie *et al.*, 2015). Les

p-values ont été ajustées selon la procédure de Benjamini-Hochberg pour quantifier le taux de faux positifs (FDR).

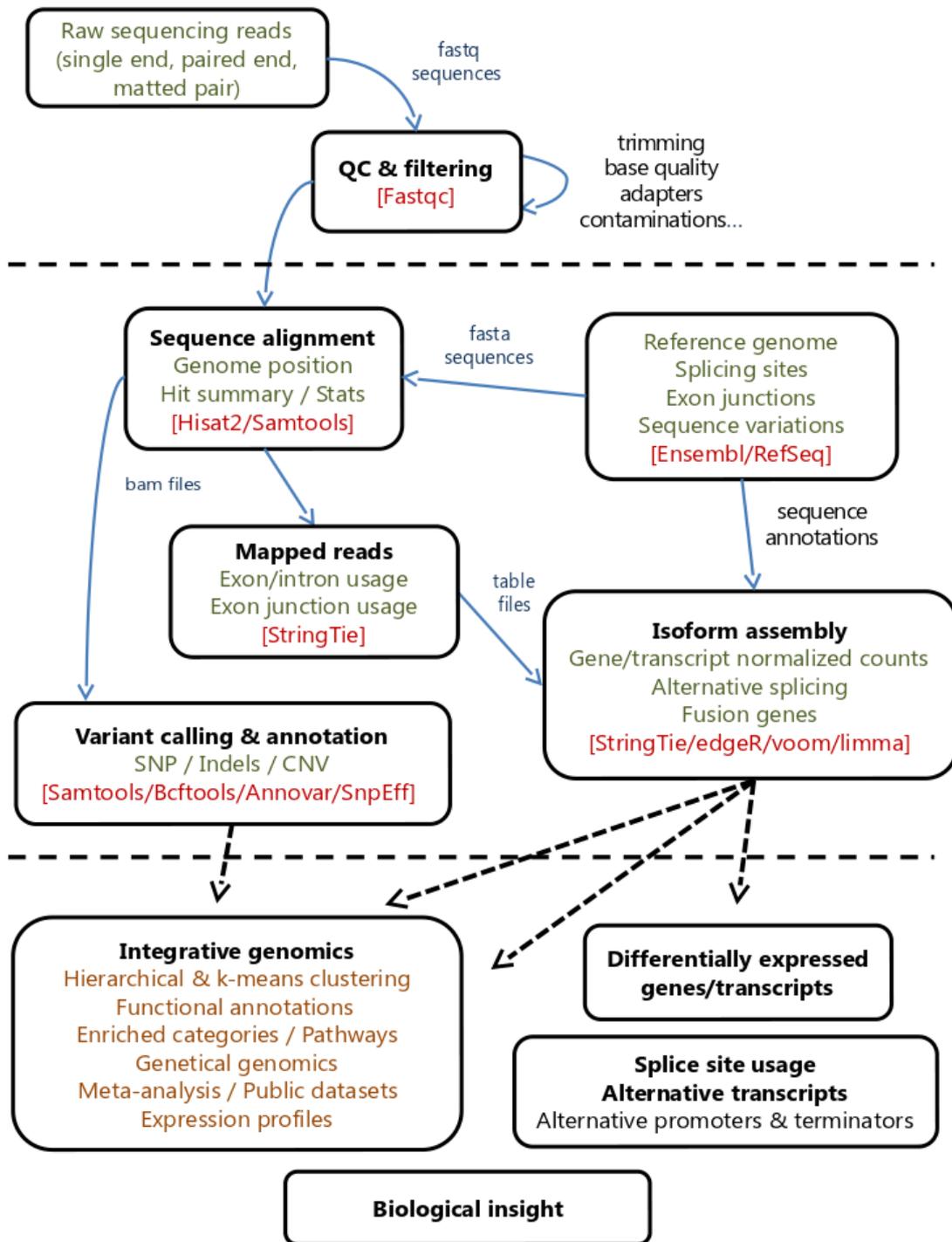
Des analyses ont également été faites pour rechercher les régions différentiellement méthylées (DMR pour differentially methylated regions). Ceci a été accompli à l'aide du package R DMRcate (Peters *et al.*, 2015), avec les paramètres: $\lambda = 1000$ et $C = 2$. Le seuil FDR pour qu'une sonde donnée puisse appartenir à une DMR a été fixée à 0,05.

Annotations

Toutes les analyses transcriptomiques ont été effectuées en utilisant la dernière version du génome humain (hg38) en tant que référence. Toutes les annotations de gènes et de transcrits sont basées sur les bases de données Ensembl (Aken *et al.*, 2016) GRCh38, version 88. Elles sont principalement extraites à partir de ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-88/mysql/homo_sapiens_core_88_38/ et ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-88/mysql/homo_sapiens_funcgen_88_38/ pour l'installation et l'accès local aux bases de données. Le fichier GTF utilisé lors de la reconstruction des isoformes peut être trouvé sur : ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-88/gtf/homo_sapiens/Homo_sapiens.GRCh38.88.gtf.gz

Les données de méthylome ont été analysées à l'aide des annotations disponibles pour la plateforme Illumina Infinium 450k. Celles-ci s'appuient fortement sur l'assemblage hg19 du génome humain. Puisque plusieurs outils comme minfi et DMRcate utilisent toujours ce type de plateforme par défaut, les annotations résultantes ont été transformées selon les positions génomiques de la version hg38.

Le « package » R biomaRt (Drost and Paszkowski, 2017) a été utilisé quand les symboles des gènes ou quand les positions génomiques devaient être convertis de façon appropriée pour pouvoir utiliser spécifiquement un programme ou pour accomplir l'intégration des données du méthylome et du transcriptome.



RNASeq pipeline

Figure 55: Le pipeline d'analyse pour le RNA-seq.

Fiche 19 : Dosage des acides aminés sur JEOL

Préparation des différents tubes pour ultracentrifugation :

- 1 vial (mélange pour analyseur jeol)
- 1 microtube eppendorf(pour mélange 50/50 avec Et interne)
- 1 microtube pour filtre + filtre Amicon

Ultracentrifugation de l'échantillon à analyser (15' à 15000rcf centri micro)

Jeter le filtre

Prélever 60µl du filtrat à mélanger dans microtube contenant 60µl de la solution E1 + E2
Vortexer et centrifuger 1.5' à 15000 rcf
Conserver l'ultrafiltrat restant (étiquetté et bouché à conserver -20°)

Récupérer 100 µl du mélange centrifugé et mettre dans vial pour analyseur JEOL ;

Saisie de la demande dans GLIMS et étiquettage prélèvement et différents tubes utilisés :

prendre 2 étiquettes AA primaire:

- 1 pour la demande
- 1 pour le tube

dans 3ème onglet saisie de la demande :

douchette N° IPP ok Patient

Analyse corriger heure

Cliquer sur pavé jaune à Droite

Sélectionner les analyses

Ok scanner N°demande et analyse

Demander 3 étiquettes : impression directe

- 1 pour tube hémolyse avec plasma
- 1 pour tube avec ultrafiltrat
- 1 pour vial JEOL

Mise en route JEOL :

Ordi reste ouvert avec bandeau Jeol en « ready »

Cliquer initialyse (initialisera 2 ' puis se remet en ready

Amorçage pompes

Cliquer sur pavé « unit »

Amorcer les pompes :RP1 cliquer dessus->fenêtre->start

EP cliquer dessus->fenêtre->start

Fermer le pavé

Cliquer sur pavé « maintenance »→pompe E/P RP

Attendre d'être à peu prêt dans les valeurs habituelles

En pressure et pulse EP, RP ;

Faire la liste de travail : cliquer pavé « Editing »

« clear » les échantillons précédents ou les laisser,
se mettre dans la 1^{ère} ligne libre :

Vial N° = n° d'emplacement sur le portoir du Jeol

Sample name = n° d'étiquette GLIMS (ex :12524540) + nom Patient

Vol = 50 µl

Profile = P 120(long 120mn)ou VAL PHE(court 25mn)

Dilution = 2

Sample runs start = vial N° à analyser

Last = dernier vial N° à analyser

SAVE-→oui : pour enregistrer la nouvelle liste de travail

Démarrage cycle d'analyses programmées :

Pavé START pour démarrer (possibilité de vérifier emplacement des Vials dans STANDBY .

START pour mise en route

27' de conditionnement + 25' de passage si prg court VAL PHE + 120' de passage si prg long P
120

monitor en cours d'analyse : pavé « view » permet de voir la chromato en tps réel sur
l'écran ;

Possibilité d'avoir des résultats imprimés en cours d'analyse :

Dans la fenêtre « View » clic sur pavé Imprimante -----→fenêtre « Stopovers Report » clic sur pavé
« print » --→qqs sec--→ impression résultats intermédiaires avec Graphe.

Run terminé : vérification intégrations et identifications automatiques

Dans la fenêtre « graphique »

Regarder le profil et la quantification de l'E1 et AEC (étalon interne)

Si correct :250+ou – 10%→tel quel ;sinon corriger par le facteur d'erreur

En « Maintenance »→data file maintenance →sélectionné le fichier brut → 000

Pavé « recalculation » en dilution :mettre facteur corrigé puis unprocessing en

Parameter table et report format ;-----→clic sur pavé « execute »

Crée un nouveau fichier 001 data avec prise en compte du facteur corrigé.

Reprendre dans la fenêtre « graphique » ce fichier 001 pour manuellement affiné ce graphe :

Open data voulu 00728101000

```
0 07 28 101 000
|  |  |  |  |
  Jour mois 1er  donnée brute
          Du jour
```

Icône manual graphics :

Zoom ---→carré vert s'ouvre sur fenêtre du dessous dans laquelle on peut intervenir ;

-- peak set : intégrer un pic --→ok

trace la ligne de base entre les 2 bornes

-- peak correct : pour corriger les bornes

-- peak delete : pour supprimer des pics ;

-- peak single baseline correct : pour corriger la ligne de base du pic

Pour identifier ou réidentifier des pics : clic sur pavé « identification »

Associer le pic voulu avec celui de la std table(données qui apparaissent sous le graphe) ;

Les corrections terminées sauvegarder ; puis en « data file

Maintenance » sélectionner ce graphe corrigé (se terminant par 001) et effectuer l'envoi des résultats dans GLIMS par le « Batch process » »

Fiche 20 : dosage des folates sur LCMSMS

Sortir les standards à 250 µM et les standards internes à 50 µM (congélateur -80°C, droite, Tiroir métabolisme)

- Acide Folique + Acide Ascorbique 1 g/L + DTT 1 g/L
- Tetrahydrofolate
- 5 Methyl THF
- 5 Formyl THF
- 5,10 Methenyl THF
- Pas de Methylene THF car instable et donc impossible à analyser préc
- ¹³C5 Methyl THF, ¹³C5 Formyl THF, ¹³C5 FA

Préparer les solutions d'acide ascorbique et DTT

- Solution Acide Ascorbique 20 mM (35.224 mg/10 ml) (placard bas salle LCMS)
- 450 mg de DTT dans 3 mL d'H₂O milliQ (1 mol/L) (réfrigérateur +4°C, salle métabolisme)
- H₂O milliQ : choisir volume, puis 2 clicks pour démarrer, 1 click pour arrêter

Sortir les échantillons : les mettre à décongeler à l'abri de la lumière, les agiter puis les centrifuger avant le dosage.

Dosages folates sur SERUMS (+ érythrocytes ou leucocytes)

Préparation de la gamme en sérum folate free S0 à S9 pour SERUMS (tubes polypropylènes de 1.5 mL). Tiroir du bas congélateur LCMS

- Préparation du sérum free dans un bécher 25 mL, avec petit barreau magnétique
- 10 mL de **SERUM (pas EDTA)**
- 80 mg de charbon actif (placard sous paillasse) Réf : 1.02186.0250 K21549186 Merck (Boite bleue pièce AB01), balance à côté de la centrif SV11RH.
- **Agitation 20 min, Centrifugation 10 min à 3500 rpm (centrif SV11RH, portoir rouge)**
- Décantier, centrifuger une 2^{ème} fois dans microtubes 13000 rpm/20 min/RT. Eliminer culot
- Préparer les Standards dans le sérum folate free
 - **40 µL** des 5 standards à 250 µmol/L QSP **1 mL H₂O milliQ** (solution à 10 µmol/L)
 - **10 µL** de la solution 10 µmol/L QSP **1 mL Sérum free** (solution à 100 nmol/L)
- Puis dilution de ½ en ½ de S9 à S1 (150 µL chaque) : 100 / 50 / 25 / 12.5 / 6.25 / 3.125 / 1.563 / 0.781 / 0.391 nmol/L

Préparation du standard interne :

- Prélever 50 µL de DTT (pour le Blanc)

- Ajouter **6 µL** de chaque standard interne (¹³C5 Methyl THF, ¹³C5 Formyl THF, ¹³C-FA)
- Dans 2.950 mL DTT 1 M (150 mg/mL)

Préparation des standards Externes :

- BioRad level 1 / 2 / 3 : Immunoassay plus Control = lyphoched IAPC BioRad (congélateur -20°C, sale H2O milliQ)
 - NIBSC-B12 / Serum Folate 03/178

Procédure :

Préparer l'évaporateur avant la distribution des réactifs : sous sorbonne, équipement Tecne DRIBlock, DB2B, réglé à 60°C. Placer sous la sortie d'azote (sans dérégler le manomètre) et utiliser la vanne rouge à l'arrière pour alimenter en azote gazeux

Dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL :

- 100 µL de Standard, ou sérums ou DTT seul (*pas de blanc H₂O car problème d'évaporation*)
- 25 µL de standard Interne (*!!! pas de SI dans les échantillons utilisés pour les tests d'incorporation de ¹³C, remplacer par 25 µL DTT 1 M !!!*), **agiter**
- 50 µL Ac. Ascorbique 20 mM. **Agiter (Vortex)** et incuber 15 min a T amb **à l'abri de la lumière**
- 225 µL MeOH, **Agiter** et incuber 30 min à 4 ° (précipitation à froid des protéines)
- **Agiter et Centrifuger 13000 rpm /min 10 min**
- Déposer 200 µL de surnageant sur des plaques PP 96 puits de 350 µL à **FOND PLAT**
- Evaporer à 60 °C sous azote (> 1h)

Préchauffer la thermosoudeuse avant la distribution des réactifs suivants (attention, risque de surchauffe de l'appareil, débrancher complètement après utilisation).

- Reprise de l'extrait sec par **100 µL H₂O** / 0.1 % Acide Formique
- Fermer la plaque avec un film et mettre sous agitation 5 min à 600 rpm

Analyse LC/MSMS

- Classeur « suivi colonne », feuillet « folates » : noter les paramètres de la colonne
- Classeur « mode d'emploi Analyst » en routine, Feuillet Folates, repérer les paramètres de fonctionnement pour l'analyse + composition des tampons et volumes. Régler la hauteur de la sonde
- Préparer les solutions A1, B1, Weak et Strong. Incuber dans la cuve à ultrasons pendant 10 min

Hauteur de sonde: 1

Colonne HSST3 5 cm

Solutions pour la phase mobile :

- Solvant A1: Ac. Acétique 100 mM (5.7 mL) + 0.1 % Acide Formique qsp 1 L **H₂O milliQ**
- Solvant B1 : 0.1 % Ac. Formique dans **MeOH**
- Weak : 0.1% Ac. Formique dans H₂O milliQ
- Strong : MeOH 100%

Equilibrage de la colonne :

- Déconnecter et retirer le raccord dans le compartiment à colonne à l'aide des clés dédiées.
- Connecter la colonne et serrer avec les clés
- Rebrancher le tuyau de sortie et fermer le compartiment.
- Eteindre le PC
- Clipser l'aimant de la colonne dans le compartiment dédié (sur le côté haut/droit de l'UPLC)
 - Attendre le Bip qui signale la connexion de la colonne et de l'UPLC
- Placer la plaque à analyser dans le portoir 1, à l'abri de la lumière

La sortie colonne est connectée à la poubelle.

- Démarrer le PC > Windows > *Analyst*
↳ Menu déroulant : FOLATES

ONGLET Configure > Hardware configuration > LCMS > Activate profile (attendre l'initialisation)

Sur le panneau de gauche, cliquer « build acquisition batch (panneau gauche) »

Open folder

↳ Charger le template

Click droit : *add sample* (ajouter le nombre de lignes manquantes sur le template)

↳ Copier/coller la liste de travail (vérifier la liste et la position des échantillons sur la plaque). Enregistrer les modifications des paramètres d'acquisition

↳ Submit (envoi la liste des échantillons en liste

d'attente)

Méthode d'Acquisition : FOLATES_FL_AC ACET_H1_13C

Méthode de quantification : Folate 20150226

↳ click Warming up : la Psi doit atteindre une valeur proche de de la dernière relevée sur le classeur

↳ « ready » : le tuyau UPLC / MS peut être connecté à la sonde.

NB : surveiller la valeur « delta » qui doit être < 10

Débit : 0.6 ml/mn

Fiche 21: Dosage B12, B9 par SimulTRAC-SNB

Procédure de dosage

- Numéroté 16 tubes pour la courbe étalon. A partir du numéro 17, numéroté deux tubes supplémentaires pour chaque échantillon clinique.
- Ajouter les étalons et les échantillons cliniques conformément aux indications données dans le tableau suivant.
- Ajouter 200 µl de solution active de marquage/DTT (réactif 2A) dans chaque tube, y compris les tubes 1 et 2. Agiter les tubes au Vortex.
- Incuber à température ambiante (18 - 25°C) pendant 15 minutes.
- Ajouter 100 µl de réactif d'extraction aux tubes 3 - 16 et aux tubes contenant des échantillons. Agiter les tubes au Vortex.
- Incuber à température ambiante (18 - 25°C) pendant 10 minutes.
- Bien agiter le flacon de réactif neutre SimulTRAC-SNB. Ajouter 1000 µl de réactif neutre aux tubes 3 et 4.
- Bien agiter le flacon de réactif de liaison SimulTRAC-SNB. Attention: Bien agiter. Ajouter 1000 µl de réactif de liaison aux tubes 5-16 et aux tubes contenant des échantillons. Agiter les tubes au Vortex.
- Incuber les tubes 3-16 et tous les tubes échantillons à température ambiante (18 - 25°C) pendant 60 minutes à partir du dernier ajout de réactif de liaison. Recouvrir le portoir de papier aluminium pour protéger de la lumière, ou le placer dans un endroit sombre.
- Centrifuger à au moins 1000 x g pendant 10 minutes, de préférence au frais.
- Décanter avec précaution, et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur un papier absorbant.
- Compter la radioactivité dans les pellets et dans les tubes 1 et 2, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma. Le nombre de coups total par minutes pour les tubes 1 et 2 doit se situer entre 10 000 et 25 000 pour le Cobalt 57, et entre 15 000 et 35 000 pour l'Iode 125, en fonction de l'appareil et de l'âge du marqueur. On peut utiliser un temps de mesure plus court, à condition que les nombres de coups pour les tubes 1 et 2 soient au moins de 10 000 (nombre de coups total).

Dosage radio-immunologique SimulTRAC-SNB

Tubes	Etalons ou éch. (µl)	Solution active marqu. (µl)	Incub.	Solution extract. (µl)	Incub.	Réactif neutre (µl)	Réactif liaison (µl)	Incub.	Centrif.
1, 2	---	200	---	--	---	---	---	---	---
3, 4	200A	200	Incuber	100	Incuber	1000	---	Incuber	Centrif.
5, 6	200A	200	tous les	100	tous les	---	1000	tous les	tous les
7, 8	200B	200	tubes à	100	tubes à	---	1000	tubes à	tubes (sf
9,10	200C	200	tempér.	100	tempér.	---	1000	tempér.	1 et 2) à
11,1	200D	200	ambiante	100	ambiante	---	1000	ambiante	1000 x g
2	200E	200	(18-25° C)	100	pendant	---	1000	(18-25° C)	pendant
13,1	200F	200	pendant	100	(18-25° C)	---	1000	pendant	10 mn
4			15 mn		10 mn			60 mn	
15,1	200	200		100		---	1000		
6									
Ech. clin.									

- Après centrifugation, décanter le surnageant et compter la radioactivité dans les pellets. Faire les calculs. Tracer la courbe étalon et déterminer les résultats des dosages cliniques.

Annexe 1 : Composition du complément B27

(La concentration des composés n'est pas annoncée par le fournisseur)

Vitamines
Biotin
DL Alpha Tocopherol Acetate
DL Alpha-Tocopherol
Vitamin A (acetate)
Proteins
BSA, fatty acid free Fraction V
Catalase
Human Recombinant Insulin
Human Transferrin
Superoxide Dismutase
Other Components
Corticosterone
D-Galactose
Ethanolamine HCl
Glutathione (reduced)
L-Carnitine HCl
Linoleic Acid
Linolenic Acid
Progesterone
Putrescine 2HCl
Sodium Selenite
T3 (triiodo-L-thyronine)

Annexe 2 : Composition du milieu DMEM no methionine (Gibco 21010324)

Components	Concentration (mg/L)
Amino Acids	
Glycine	30.0
L-Arginine hydrochloride	84.0
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	42.0
L-Isoleucine	105.0
L-Leucine	105.0
L-Lysine hydrochloride	146.0
L-Phenylalanine	66.0
L-Serine	42.0
L-Threonine	95.0
L-Tryptophan	16.0
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	104.0
L-Valine	94.0
Vitamins	
Choline chloride	4.0
D-Calcium pantothenate	4.0
Folic Acid	4.0
Niacinamide	4.0
Pyridoxine hydrochloride	4.0
Riboflavin	0.4
Thiamine hydrochloride	4.0
i-Inositol	7.2
Inorganic Salts	
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	200.0
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.1
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	97.67
Potassium Chloride (KCl)	400.0
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	3700.0
Sodium Chloride (NaCl)	6400.0
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	125.0
Other Components	
D-Glucose (Dextrose)	4500.0
Phenol Red	15.0

Annexe 3 : Composition du milieu DMEM-F12(D6434)

COMPONENT	g/L	COMPONENT	g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	-	L-Proline	0,01725
NH ₄ BO ₃	-	L-Serine	0,02625
CaCl ₂	-	L-Threonine	0,05345
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,1545	L-Tryptophan	0,00902
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,0000013	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0,05579
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	0,00005	L-Valine	0,05285
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0,000417	Vitamins	
MgCl ₂ • 6H ₂ O	0,0612	D-Biotin	0,0000035
MgSO ₄	0,04884	Choline Chloride	0,00898
MnSO ₄	-	Folic Acid	0,00266
NiCl ₂	-	myo-Inositol	0,0126
KCl	0,3118	Niacinamide	0,00202
NaHCO ₃	1,2	D-Pantothenic Acid • ½Ca	0,00224
NaCl	6,996	Pyridoxal • HCl	0,002
NaSiO ₃ • 9H ₂ O	-	Pyridoxine • HCl	0,002031
Na ₂ SeO ₃	-	Riboflavin	0,000219
Na ₂ HPO ₄	0,07102	Thiamine • HCl	0,00217
NaH ₂ PO ₄	0,0543	Vitamin B12	0,00068
SnCl ₂ • 7H ₂ O	-	Other	
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,000432	D-Glucose	3,15
Amino Acids		HEPES	3,5745
L-Alanine	0,00445	Hypoxanthine	0,00244
L-Alanyl-L-Glutamine	-	Linoleic Acid	0,000042
L-Arginine • HCl	0,1475	Phenol Red • Na	-
L-Asparagine • H ₂ O	0,0075	Putrescine • 2HCl	0,000081
L-Aspartic Acid	0,00665	Pyruvic Acid • Na	0,055
L-Cystine • 2HCl	0,03129	DL-Thioctic Acid	0,000105
L-Cysteine • HCl • H ₂ O	0,01756	Thymidine	0,000365
L-Glutamic Acid	0,00735	ADD	
L-Glutamine	-	NaHCO ₃	-
Glycine	0,01875	CaCl ₂ • 2H ₂ O	-
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0,03148	L-Glutamine	0,365
L-Isoleucine	0,05447	L-Leucine	-
L-Leucine	0,05905	L-Lysine • HCl	-
L-Lysine • HCl	0,09125	MgCl ₂ • 6H ₂ O	-
L-Methionine	0,01724	MgSO ₄	-
L-Phenylalanine	0,03548	L-Methionine	-

Annexe 4 : CARM1 et PRMT1 ne s'hétérodimérisent pas malgré la prédiction de l'existence dans l'hétérodimère d'une interface moléculaire similaire aux interfaces retrouvées dans les homodimères CARM1/CARM1 et PRMT1/PRMT1

Immédiatement après ma première inscription en thèse, j'ai effectué un travail, qui a duré un an et demi, et qui a porté sur les arginines méthyltransférases CARM1 et PRMT1. L'objectif était de poursuivre un projet conduit antérieurement au laboratoire. En effet, l'étudiante en thèse qui était inscrite avant moi avait commencé à travailler sur ce sujet et ses résultats sont résumés ci-après selon le format d'un « abstract » :

CARM1 et PRMT1 sont deux protéines Arginine Methyl Transferases impliquées dans la co-activation transcriptionnelle, connues pour être actives sous forme d'homodimères. La phosphorylation de CARM1 sur la sérine 229 chez le rat, et 228 chez les êtres humains, empêche son homodimérisation. Nous avons émis l'hypothèse que CARM1 et PRMT1 forment des hétérodimères et que l'hétérodimérisation influe sur les propriétés fonctionnelles du CARM1. Nous avons constaté que CARM1 n'est pas phosphorylée sur la sérine 228 et qu'elle forme un hétérodimère avec PRMT1 dans le noyau des cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549. En revanche, dans les cellules d'adénocarcinome du poumon H1299 et les cellules d'adénocarcinome du côlon Caco2/TC7, CARM1 phosphorylée sur la sérine 228 est détectée dans le cytoplasme (et pas dans le noyau) et ne s'hétérodimérise pas avec PRMT1. L'inhibiteur de la kinase MAP2K3, PD184352, supprime la phosphorylation de CARM1 sur la sérine 228 et rétablit l'hétérodimérisation CARM1/PRMT1 dans le noyau dans les cellules H1299 et Caco2 /TC7. CARM1 méthyle les promoteurs des gènes de pluripotence Sox2 et Nanog uniquement lorsqu'elle forme un hétérodimère avec PRMT1 dans le noyau. La modélisation moléculaire de la protéine de rat montre que la phosphorylation du résidu sérine 229 de CARM1 interrompt l'interaction entre l'asparagine 230 de CARM1 et l'aspartate 205 de PRMT1 et abroge l'hétérodimérisation CARM1 / PRMT1. En conclusion, l'hétérodimérisation de CARM1 et PRMT1, induite par MAP2K3 qui inhibe la phosphorylation de CARM1 sur la sérine 228, est un nouveau mécanisme de régulation qui retient CARM1 sous forme active dans le noyau lui permettant ainsi de méthyle des gènes cibles.

Durant le travail que j'ai réalisé par la suite, je n'ai pas reproduit les mêmes résultats et j'ai même obtenu des résultats discordants résumés ci-après selon la forme d'un "abstract" : CARM1 et PRMT1 sont deux protéines Arginine Methyl Transferases impliquées dans la co-activation transcriptionnelle, connues pour être actives sous forme d'homodimères. La phosphorylation de CARM1 sur la sérine 229 chez la souris empêche son homodimérisation

et supprime son activité méthyltransférase. Des études antérieures ont révélé que les PRMT peuvent former des hétérodimères. D'autre part, une analyse microarray a révélé que l'expression de plusieurs gènes est contrôlée conjointement par les deux enzymes. La question de savoir si cette régulation synergique est médiée par la formation d'un hétérodimère CARM1 / PRMT1 n'est pas élucidée. Nous avons effectué une modélisation moléculaire qui a montré que des interactions polaires semblables à celles qui verrouillent l'interface CARM1/CARM1 existent dans l'interface CARM1/PRMT1. Comme pour l'homodimère CARM1, la phosphorylation de la sérine 229 de CARM1 perturberait l'hétérodimère putatif CARM1/PRMT1. Cependant, dans 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire, A549 et HT1299, CARM1 endogène et PRMT1 n'ont pas co-immunoprécipité. Afin de préciser ce résultat, la sérine 229 de HA-CARM1 type sauvage de souris a été mutée en alanine et en acide glutamique, puis les 3 variants génétiques ont été exprimées dans des cellules HT1299 conjointement avec FLAG-PRMT1. Aucun des variants génétiques HA-CARM1 n'a co-précipité ni avec PRMT1 ni avec FLAG-PRMT1 et aucune des isoformes des protéines HA-CARM1 n'a été détectée dans un compartiment cellulaire préférentiel comme ceci a été démontré avec un anticorps anti-HA. Au total, ces résultats suggèrent que la régulation conjointe d'un certain nombre de gènes par CARM1 et PRMT1 ne résulte pas de leur hétérodimérisation malgré les interactions polaires potentielles qui existent entre les protéines CARM1 et PRMT1 révélées par la modélisation tridimensionnelle. D'autres mécanismes doivent expliquer pourquoi les deux enzymes sont nécessaires pour réguler conjointement des gènes cibles.

Les résultats de mon travail sur CARM1/PRMT1 sont décrits dans l'article ci-dessous qui est prêt à être soumis. Cependant, faute de moyens techniques suffisamment performants pour explorer en profondeur l'interaction entre CARM1 et PRMT1 (absence d'un anticorps spécifique capable de reconnaître CARM1 phosphorylée, impossibilité de marquer CARM1 avec ³²P et d'analyser CARM1 phosphorylée en spectroscopie de masse...), le sujet CARM1/PRMT1 a été abandonné par le laboratoire et j'ai pris en charge le travail sur la méthionine dépendance dans les cellules souches cancéreuses qui a constitué le sujet de ma thèse décrit dans ce manuscrit.

CARM1 and PRMT1 do not heterodimerize despite a predicted interface similar to that found in each protein homodimer

Rania Elakoum^{a,b}, Racha Zgheib^{a,b}, Rose Ghemrawi^b, Hassan Melhem^b, Jérémie Raso^b, Nadir Mrabet^b, Shyue-Fang Battaglia^b, Natacha Dreumont^b, Laurent Peyrin-Biroulet^b, Jean-Louis Guéant^b, Farès Namour^{b,#}

^a contributed equally to this work

^bINSERM NGERE UMR 954 Vandoeuvre F-54500, France

To whom correspondence should be addressed: INSERM UMR 954, Faculté de Médecine, 9 ave Forêt de Haye, BP 184, 54511 Vandoeuvre France, Tel : 03 83 68 32 92, Fax : 03 83 68 32 79, e-mail: bernard.namour@univ-lorraine.fr

Rania Elakoum : 01raniaakoum@gmail.com; Racha Zgheib: rachazgheib@gmail.com; Rose Ghemrawi : rose.ghemrawi@hotmail.com; Hassan Melhem : hassan.melhem@hotmail.fr; Jeremie Raso : jeremie.raso@univ-lorraine.fr; Nadir Mrabet : nadir.mrabet@univ-lorraine.fr; Shyue-Fang Battaglia : shyue-fang.battaglia@univ-lorraine.fr; Natacha Dreumont : natacha.dreumont-schuller@univ-lorraine.fr; Laurent Peyrin-Biroulet : peyrinbiroulet@gmail.com; Jean-Louis Guéant : jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr

Abstract

Background. CARM1 and PRMT1 are two Protein Arginine Methyl Transferases involved in transcriptional co-activation, known to be active as homodimers. CARM1 phosphorylation at serine 229 in mice prevents its homodimerization and abolishes its methyltransferase activity. Previous studies reported that PRMTs can form heterodimers. A microarray analysis revealed that several genes are jointly controlled by both enzymes. Whether this synergistic regulation is mediated by the formation of a CARM1/PRMT1 heterodimer remains an open question. **Results.** We performed a molecular docking that showed that polar interactions similar to the ones that lock CARM1/CARM1 interface exist in a modeled CARM1/PRMT1 interface. Like for CARM1 homodimer, phosphorylation of CARM1 serine 229 would disrupt the putative CARM1/PRMT1 heterodimer. However, in 2 lung adenocarcinoma cell lines, A549 and HT1299 cells, endogenous CARM1 and PRMT1 did not co-immunoprecipitate. Wild type murine HA-CARM1 serine 229 was mutated to alanine and glutamic acid at position 229 then the 3 genetic variants were exogenously expressed in HT 1299 cells together with FLAG-PRMT1. None of HA-CARM1 genetic variants co-precipitated with PRMT1 or FLAG-PRMT1 and none of HA-CARM1 protein isoforms predominantly localized in a specific cell compartment. **Conclusion.** Taken together these results suggest that the joint regulation of a number of genes by CARM1 and PRMT1 does not result from their heterodimerization despite potential polar interactions between them. Other mechanisms must explain why both enzymes are required to jointly regulate common target genes.

Key words: CARM1, PRMT1, heterodimer, gene regulation

Background

Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs) catalyze methylation of arginine residues within proteins by transferring one or two methyl groups from S-adenosylmethionine to the guanidino nitrogens of arginine. This post-translational modification contributes to regulate gene expression. In mammalian cells, nine PRMTs are identified to date that catalyze monomethyl arginine formation; they are classified in 2 types: type 1 PRMTs (PRMT1, 2, 4, 6 and 8) additionally produce asymmetric dimethyl-arginine and type 2 PRMTs (PRMT5, 7 and 9) produce symmetric dimethyl-arginine (Bedford and Clarke, 2009). CARM1 (or PRMT4), Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1, enhance transcription of nuclear receptors (Chen *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2006) and additionally methylates several targets such as PABP1 (Poly(A)-Binding Protein), HuR (Human Antigen R) and many splicing factors (Bedford and Clarke, 2009). CARM1 also functions as a co-repressor in c-AMP signaling (Xu *et al.*, 2001). It methylates arginine residues 17 and 26 in histones H3. PRMT1 is responsible for the bulk methylation activity (85%) in human cells (Tang *et al.*, 2000b) and targets many proteins including nuclear receptors (Barrero and Malik, 2006; Le Romancer *et al.*, 2008) and RNA binding proteins (Chiou *et al.*, 2007; Liu and Dreyfuss, 1995). It methylates arginine residue 3 in histone H4. CARM1 and PRMT1 seem to regulate gene expression synergistically (Kleinschmidt *et al.*, 2008). CARM1 and PRMT1 are dysregulated in various types of cancers (Davis *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2010; Ou *et al.*, 2011; Yoshimatsu *et al.*, 2011). Moreover, arginine methylation was shown to be critical for maintaining pluripotency in the early mouse embryo and embryonic stem cells (Torres-Padilla *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009).

A common feature of PRMTs is that they are active as homodimers displaying an open-ring cleft for substrate binding (Troffer-Charlier *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2000; Yue *et al.*, 2007; Zhang and Cheng, 2003; Zhang *et al.*, 2000) involving head to tail interactions (Zhou *et al.*, 2009). However the existence of PRMT heterodimers has been previously described (Pak *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2010).

CARM1 can be phosphorylated at several serine residues. In murine CARM1 (NP_067506), phosphorylation of Ser229 prevents its homodimerisation and abolishes its enzymatic activity (Higashimoto *et al.*, 2007). The equivalent residue of murine CARM1 Ser229 is Ser228 in humans.

The synergistic effects of CARM1 and PRMT1 in gene expression regulation and the previous studies reporting that PRMTs can form heterodimers suggest that both protein might heterodimerize. Since Ser229 phosphorylation disrupts the interaction between two CARM1 monomers we hypothesized that it could similarly disrupt putative CARM1/PRMT1 heterodimers. We started by modeling the presumed CARM1/PRMT1 heterodimer in order to verify that the heterodimer interface resembles the CARM1 homodimer interface. Then we used a wild type HA-CARM1 Ser229 plasmid to construct two vectors for expressing mutant CARM1 Ser229Ala (serine to alanine mutation) and CARM1 Ser229Glu (serine to glutamic acid mutation). The serine to alanine mutation was expected to abolish phosphorylation, whereas the serine to glutamic acid mutation was expected to mimic the serine phosphorylated side chain and behave like a phosphorylated serine. We also constructed a FLAG-PRMT1 vector. These genetic variants were used, in 2 lung adenocarcinoma cell lines A549 and HT1299 cells, in co-immunoprecipitation experiments in order to determine if CARM1 interacts with PRMT1 and in

immunofluorescence in order to determine if residue 229 regulates CARM1 sub-cellular localization.

Material and Methods

Modeling and docking analyses of the putative interaction between CARM1 and PRMT1

Molecular modeling was done on a Silicon Graphics O2 R10000 station, under IRIX 6.5, using the BRUGEL package (Huysmans *et al.*, 1991). Selection of CARM1 and PRMT1 3D structures was based on best resolution available for S-Adenosyl-Homocystein bound proteins. Structures were further optimized with the BRUGEL molecular modeling package following 2 successive rounds, each consisting of hydrogen atoms construction/optimization with heavy atoms fully constrained and then 1000 steps of unrestrained steepest-descent energy minimization. Full hydrogen atoms structures of both proteins were subsequently docked using the ClusPro 2.0 server <http://cluspro.bu.edu/login.php> (Kozakov *et al.*, 2010). The resulting interaction models were then analyzed in BRUGEL.

Cell culture and proliferation assay

The cell lines A549 and HT1299 were maintained in RPMI 1640 (Sigma) at 37°C, 5% CO₂, supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio) and 1% antibiotics penicilline, streptomycine (Gibco). Cell growth was documented every 48h via a colorimetric assay using a 3-(4,5-dimethylthiawol-2-yl)-2,5-diphenytetrazolium bromide (MTT) assay. Absorbance values were collected at 570nm using the Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific). In each individual

experiment, proliferation was determined in quadruplicate and the overall experiment was repeated three times.

Plasmids

The mammalian expression vector for mouse CARM1 (pSG5-HA-CARM1) was a gift from Michael R. Stallcup (University of Southern California). CARM1 mutants Ser229Ala and Ser229Glu were constructed by PCR-based site-directed mutagenesis (QuickChange XL Site-directed Mutagenesis kit, Agilent) and verified by sequencing. Prmt1 cDNA was amplified from a pExpress-1 vector-containing rat PRMT1 (BC 078815, NP_07739.1, Dharmacon) using the forward primer (AAAAAGCTTATGGCGGCAGCCGAGGCCGCGAAC) and the reverse primer (AATGGATCCTCAGCGCATCCGGTAGTCGGTGGAAC). The PCR product was digested with Bam HI and Hind III and inserted into PTT3-Flag.

Total protein extraction and Western Blot analysis

Protein were extracted with RIPA buffer (50mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 N, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM NaF, 1mM sodium orthovanate) and protease inhibitor (Roche Applied Science), separated by SDS-PAGE and transferred to 0.22µm nitrocellulose membranes (Biorad). Western Blotting was performed with the following antibodies: anti-CARM1 (1/1000, rabbit polyclonal Millipore cat. 09.818), anti-PRMT1 (1/700, rabbit monoclonal Cell Signaling cat. A33), anti-HA (mouse, Covance cat.MMS-101P), anti-FLAG (FLAG M2, DYKDDDDK Tag, mouse, Cell Signaling, cat. 8146), anti-phospho-Ser228-CARM1 (1/500, rabbit monoclonal Millipore cat. ABE12). Equal protein loading was confirmed using anti-GAPDH antibody (1/1000, chicken polyclonal Millipore cat.

Ab2302). Images were analyzed with the Image J software and are representative of 3 independent immunoblots.

Co-Immunoprecipitation

Immunoprecipitations were carried out with a Pierce kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Ten micrograms of the primary antibody (anti-CARM1 or anti-PRMT1) were incubated with the resin provided in the kit. The antibody-coupled resin was incubated with 500 µg whole cell lysate overnight at 4°C. The resin was washed and the protein complexes bound to the antibody were eluted and subjected to Western Blotting.

Immunofluorescence

Human A549 and HT1299 cells were cultured on poly-L-lysine-precoated glass coverslips for 24h, washed, fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at 4 °C and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Nonspecific binding sites were blocked for 1h in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin (BSA). Cells were then incubated with primary antibodies overnight in a humid chamber at 4 °C under a gentle agitation. After 4 washing steps in BSA/PBST for 5 min, they were incubated with the appropriate secondary antibody for 1 h at room temperature under a gentle agitation. Detection of the nucleus was done with the nuclear fluorescent dye 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.43 µg/ml in PBS; Sigma, Lyon, France). Finally, glass coverslips were washed four times in PBS and mounted using a minimal volume of paramount mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA). The immunostained cells were imaged using Nikon C2

equipped with three laser lines (405, 488 and 543). The images were obtained with x20 and x60 magnification lens.

Results

Modelisation of CARM1 and PRMT1 heterodimerization

Modelisation experiments showed that in the CARM1 homodimer, Ser229 and Asn230 in one monomer would interact with Asp323 in the other monomer and that these interactions correspond to the Ala114-Asp205 and Asn115-Asp205 contact pairs in the PRMT1 homodimer. In the CARM1/PRMT1 heterodimer, CARM1 Ser229-Asn230 pair belongs to the largest interface and is involved in van der Waals interactions with PRMT1 Cys208 and hydrogen bond pairing with PRMT1 Asp205 (Figure.1). The hydrogen bond pair between CARM1 Asn230 and PRMT1 Asp205 is the most stabilizing in the CARM1/PRMT1 interface (- 3.0 kcal.mol⁻¹). There is also a hydrogen bond between CARM1 Asp323 and PRMT1 Asn115. This heterodimer model is coincident with the CARM1 homodimer interface around positions 229-230 and thereby provides an *in silico* rationalization that prompted us to investigate a possible interaction between CARM1 and PRMT1 inside the cell. If this interaction exists, phosphorylation of CARM1 at Ser229 would generate charge repulsion effects that would prevent assembly with PRMT1 which bears Asp205 as the tight direct partner with this serine residue.

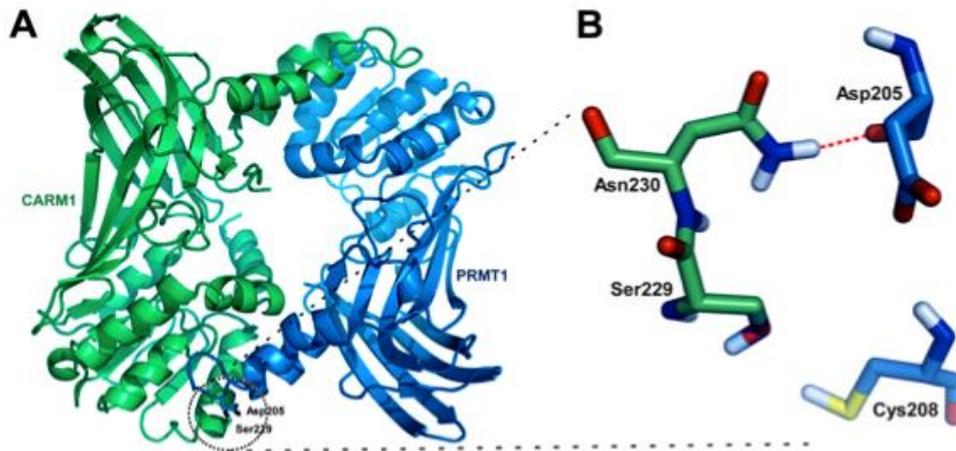


Figure 56: Putative assembly of CARM1 and PRMT1 monomers to form a heterodimer.

Figure 1A. Heterodimer assembly of rat CARM1 and PRMT1 in the cartoon mode (lime-green for CARM1 and sky-blue for PRMT1) showing that the mode of heterodimerization conforms to rules that prevail in the PRMT family. The CARM1 Ser229/PRMT1 Asp205 pair is emphasized and enlarged. Figure 1B is a display of the structure of the heterodimer interaction involving Ser229 and Asn230 of rat CARM1 and Asp205 and Cys208 of rat PRMT1 and reveals the hydrogen bond made between Asn230 and main-chain carbonyl oxygen of Asp205. Cys208 is close enough to make van der Waals contacts with Ser229.

CARM1 and PRMT1 do not interact in A549 and HT1299 cells.

The MTT assay showed that A549 and HT1299 cells are proliferating between day 4 and day 9 and that starting from day 9 they reach a “plateau phase” (Figure.2). We decided to analyze the cells at day 6 and 9 because gene expression might be different while cells are proliferating and after they stop proliferation.

In A549 and HT1299 cells, Western Blot analysis with the anti-CARM1 antibody showed that endogenous CARM1 was not coprecipitated by an anti-PRMT1 antibody. Likewise, Western Blot with anti-PRMT1 antibody showed that endogenous PRMT1 was not coprecipitated by an anti-CARM1 (Figure.3). We wanted to determine if protein overexpression can trigger CARM1/PRMT1 interaction. We mutated a wild type murine Ser229 HA-CARM1 construct to Glu229 (mutant

Ser229Glu) and Ala229 (mutant Ser229Ala) and co-transfected separately each genetic variant with FLAG-PRMT1 in HT1299 cells. Western Blot analysis with antibodies directed against FLAG peptide and PRMT1 showed that PRMT1 is not co-precipitated by the anti-HA antibody (Figure.4).

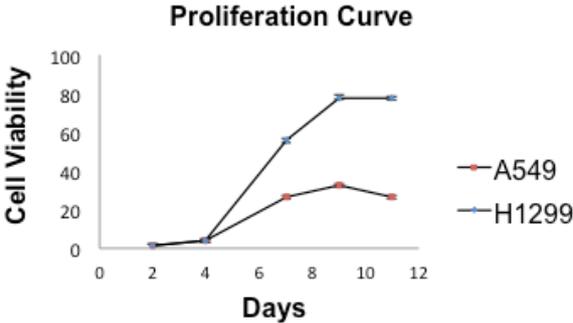


Figure 57: A549 and HT1299 cell growth measured by MTT assay.

A549 and HT1299 cells are in a proliferating phase at day 6 and reach the « plateau » phase at day 9. Data are reported as mean ± SEM

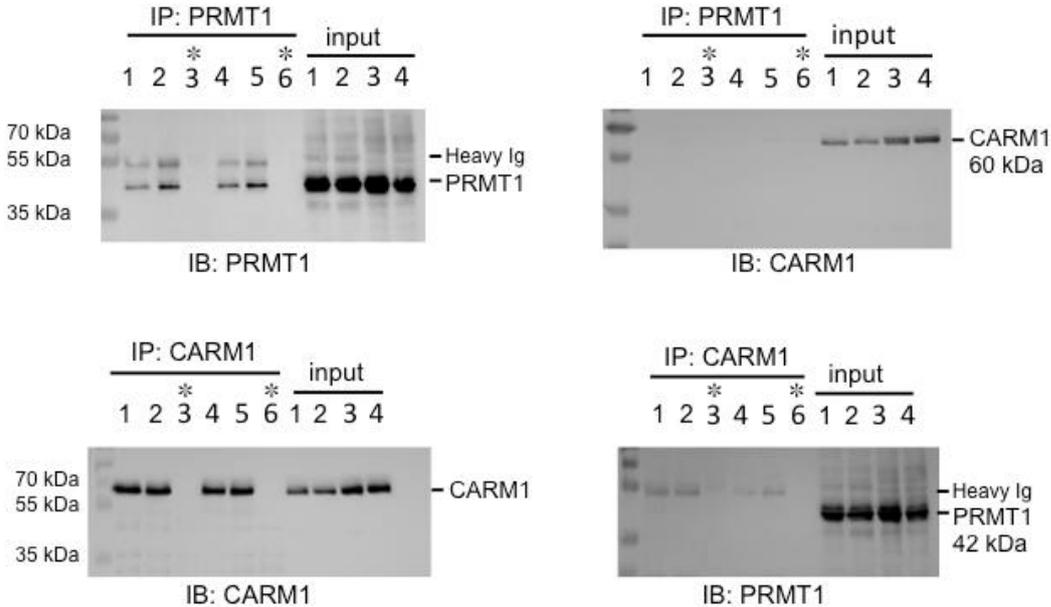


Figure 58 In A549 and HT1299 cells, anti-PRMT1 does not co-precipitate endogenous CARM1 and anti-CARM1 does not co-precipitates endogenous PRMT1 neither at day 6 in the proliferation phase nor at day 9 when the cells stop proliferating.

*Anti-PRMT1 and anti-CARM1 immunoprecipitates from A549 and HT1299 cells were separated by SDS-PAGE, transferred onto a membrane and probed with anti-PRMT1 and anti-CARM1 antibodies. 1= A549 day 6, 2= A549 day 9, 3= A549 mock, 4= HT1299 day 6, 5= HT1299 day 9, 6= HT1299 mock ; * indicates mock IP*

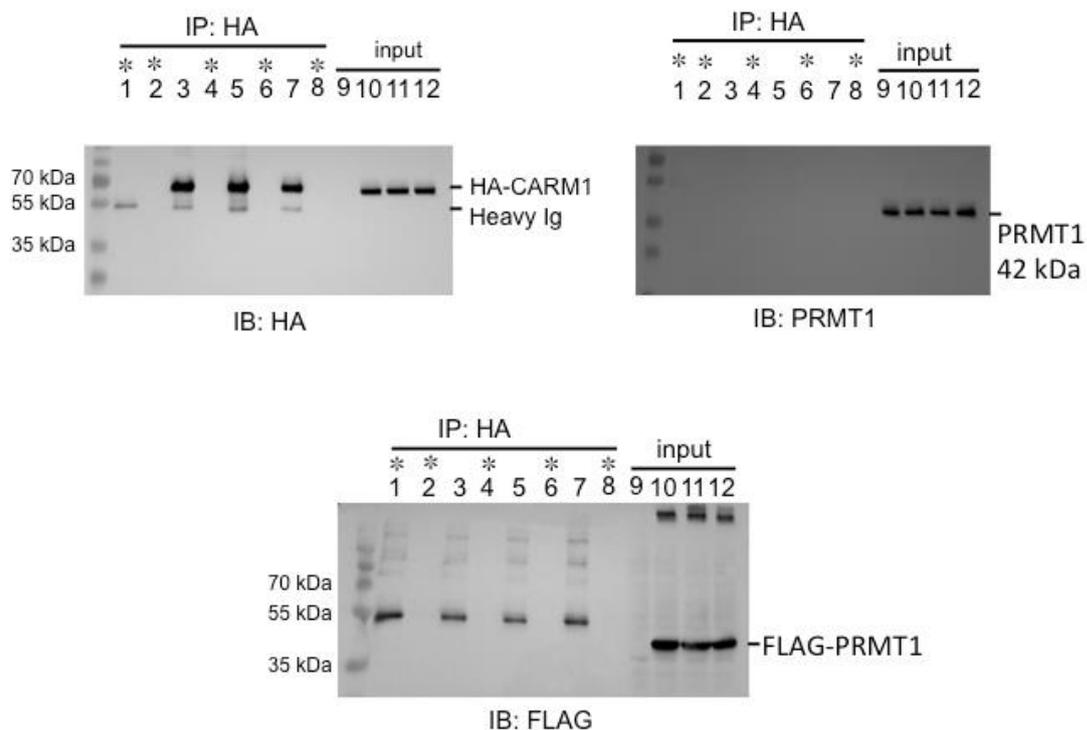


Figure 59: In HT1299 cells, HA-CARM1 does not interact neither with PRMT1 nor FLAG-PRMT1 neither at day 6 in the proliferation phase nor at day 9 when the cells stop proliferating.

*Cells were co-transfected with plasmid HA-CARM1 and plasmid FLAG-PRMT1 then anti-HA immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred onto a membrane and probed with anti-HA, anti-PRMT1 and anti-FLAG antibodies. 1= non transfected HT1299 cells lysate incubated with anti-HA antibody; 2= non transfected HT1299 cells lysate with no incubation with anti-HA antibody; 3= lysate of HT1299 cells, transfected with **wild type** HA-CARM1 Ser229 plasmid, incubated with anti-HA antibody, 4= lysate of HT1299 cells transfected with wild type HA-CARM1 Ser229 plasmid, without incubation with anti-HA antibody; 5= lysate of*

HT1299 cells, transfected with mutated HA-CARM1 **Ala229 plasmid**, incubated with anti-HA antibody; **6**= lysate of HT1299 cells, transfected with mutated HA-CARM1 Ala229 plasmid, without incubation with anti-HA antibody; **7**= lysate of HT1299 cells, transfected with **mutated HA-CARM1 Glu229 plasmid**, incubated with anti-HA antibody; **8**= lysate of HT1299 cells, transfected with mutated HA-CARM1 Glu229 plasmid, without incubation with anti-HA antibody; 9= HT1299 cell lysate, 10= lysate of HT1299 cells transfected with wild type HA-CARM1 Ser229 plasmid, 11= lysate of HT1299 cells transfected with HA-CARM1 Ala229 plasmid, 12= = lysate of HT1299 cells transfected with HA-CARM1 Glu229 plasmid; * indicates mock IP

Mimicking Ser229 phosphorylation does not promote a preferential CARM1 subcellular localization

We next examined whether mimicking Ser229 phosphorylation could play a role similar to Ser217 phosphorylation in murine CARM1 by directing CARM1 towards the cytoplasm (Feng *et al.*, 2009). HA-tagged wild type CARM1 and Ser229Glu and Ser229Ala mutants were transiently expressed in HT1299 cells and immunofluorescence staining was performed with anti-HA antibody (Figure.5). All three genetic variants were detected in both the nucleus and cytoplasm. These results suggest that CARM1 subcellular localization is not regulated by ser229 phosphorylation. We could not directly search for ser229 phosphorylated CARM1 in the cells because the antibody raised against phosphorylated ser229 was not specific and reacted with all 3 genetic variants.

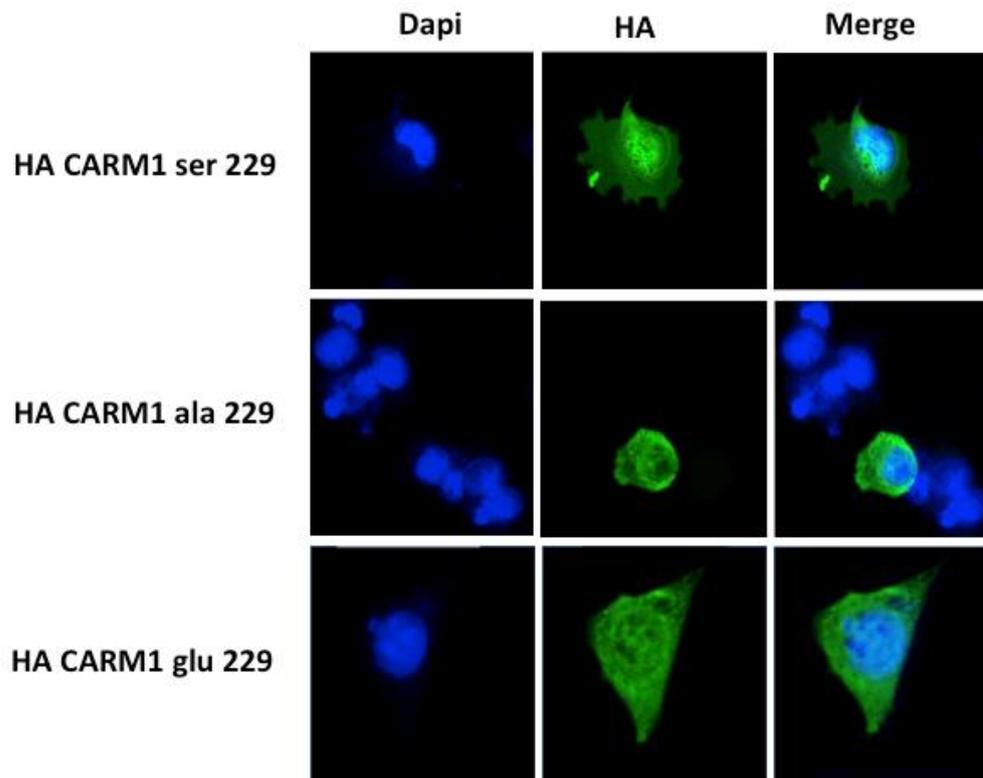


Figure 60: Wild type ser229 HA-CARM1 and mutated variants ser229ala and ser229glu localize in both the nucleus and cytoplasm.

HA-CARM1 Ser229, HA-CARM1 Ala229 and HA-CARM1 Glu229 proteins were exogenously expressed in HT1299 cells. HA staining shows the CARM1 protein and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) shows the DNA. No variant displays a preferential localization indicating that mutation of serine 229 does not prevent CARM1 from shuttling between the nucleus and cytoplasm

Discussion

PRMTs are known to be active as homodimers. However, previous studies reported that PRMTs can form heterodimers. In one study, Förster Resonance Energy Transfer (FRET) was used to determine dissociation constant values for dimerization of PRMT1 and PRMT6 (Thomas *et al.*, 2010). The results confirmed that PRMT1 and PRMT6 can homodimerize and even that PRMT1, but not PRMT6, can form high order oligomers beyond dimers. This study revealed that PRMT1/6 heterodimers

could form but they are not likely to compose a quantifiable population in vivo given the tight association between their respective homodimers. Another study using notably bimolecular fluorescence complementation yielded different results by showing that PRMT1 and PRMT2 do interact in vitro and in cells and that the heterodimer formation increases PRMT1 activity (Pak *et al.*, 2011). The conclusion was that PRMT1 serves as the major methyltransferase in cells by forming higher-order oligomers with itself, PRMT2, and possibly other PRMTs. However, we provide evidence in our study that PRMT1 does not interact with CARM1 even though the modelisation predicts that such an association could be possible. This lack of interaction was confirmed in the proliferation and plateau phase to account for any change in protein expression, modification or subcellular localization that might occur during cell growth. The fact that the dimer-contacting residues are conserved among human PRMT family members (Pak *et al.*, 2011) explains why modelisation shows similarity between the interfaces of PRMT homodimers and a putative CARM1/PRMT1 heterodimer. Undoubtedly, varied heteromeric PRMT combinations serve a purpose by uniting forces to provide methyltransferase activity directed towards a wide array of specific non-overlapping targets thus increasing the diversity of PRMT functions in the cell. Based on our findings, the synergistic action of CARM1 and PRMT1 in regulating gene expression (Kleinschmidt *et al.*, 2008) is not due to the formation of a CARM1/PRMT1 heterodimer but to the simultaneous recruitment of the two proteins to a common promoter.

Precedent reports indicated that PRMTs display different subcellular localization in different cell types and even that one individual PRMT can localize in different compartments in a given cell type depending on the cell cycle (Herrmann *et al.*, 2009). Other reasons explaining this mobility is that alternative splicing produces

isoforms that localize differently (Goulet *et al.*, 2007). Interestingly, PRMT1 and CARM1 seem to move together inside the cell: they localize predominantly in the cytoplasm in HEK293 cells and U2OS cells (although in U2OS cells some cells display enrichment in the nucleus) and in the nucleus in HeLa and MCF7 cells (Herrmann *et al.*, 2009). In our study, we report that PRMT1 and CARM1 are mainly nuclear proteins in A549 and HT1299 cells (lung adenocarcinoma). It is not surprising to detect PRMT1 and CARM1 in the nucleus and the cytoplasm: their functions in the nucleus include regulation of transcription and mRNA splicing and they have also several substrates in the cytoplasm including RNA binding proteins.

Because the available phospho-Ser228-CARM1 antibodies are not specific, we were unable to directly analyze phospho-CARM1. We used the mutants CARM1 Ser229Ala and CARM1 Ser229Glu to mimic the non phosphorylated and phosphorylated serine residues, respectively. Mimicking serine 229 phosphorylation did not influence CARM1 protein distribution in A549 and HT1299 cells since the three genetic variants, the wild type CARM1 Ser229 and the mutants CARM1 Ala229 and CARM1 Glu229, similarly localized both in the nucleus and cytoplasm. Previous reports indicated that CARM1 can be phosphorylated at several residues. Phosphorylation at serine residue 217 occurs mainly during mitosis, abolishes its methyltransferase activity by preventing S-adenosylmethionine binding and promotes its translocation into the cytoplasm (Feng *et al.*, 2009). Phosphorylation at residue 229 occurs during mitosis and abolishes CARM1 methyltransferase activity by preventing dimerization (Higashimoto *et al.*, 2007). Here we provide evidence suggesting that serine 229 phosphorylation does not promote CARM1 translocation into the cytoplasm. The kinases responsible for serine 217 and 229 phosphorylation are unknown. However, Protein Kinase A (PKA) phosphorylates CARM1 at serine

448. Phospho-Ser448-CARM1 binds the unliganded hormone binding domain of Estrogen Receptor alpha resulting in cAMP activation of ER alpha (Carascossa *et al.*, 2010). Whether phosphorylation of serine 448 inhibits CARM1 methyltransferase activity or its dimerization or whether it triggers its cellular redistribution remains to be determined. Thus, phosphorylation at different sites results in distinct mechanisms that regulate CARM1 function.

Conclusion

Our data show that the joint regulation of a number of genes exhibited by CARM1 and PRMT1 does not result from their heterodimerization, despite potential polar interactions between them, at least in the two A549 and HT1299 cell lines. This suggests that other mechanisms must explain why both enzymes jointly regulate target genes.

Abbreviations

Ala: Alanine

Asn: Asparagine

Asp: Aspartate

BSA: Bovine Serum Albumin

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate

CARM1: Co Activator Arginine Methyltransferase 1

DAPI: 4, 6-Diamidino-2-Phenylindole

ER: Estrogen Receptor

Glu: Glutamate

HA : Human Influenza Hemagglutinin

HuR: Human Antigen R

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

PABP1: Poly(A)-Binding Protein

PBS: Phosphate Buffer Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PKA: Protein Kinase A

PRMT: Protein Arginine Methyl Transferase

PRMT1: Protein Arginine Methyl Transferase

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Ser: Serine

Declaration

Ethical Approval and Consent to Participate: No ethical approval and no consent from patients were needed for this study

Consent for publication: not applicable

Availability of supporting data: All data generated during the current study are available from the corresponding author upon request.

Competing interests: The authors declare no conflict of interests

Funding: Funding was provided by INSERM UMR 954

Author's contributions: RE, RZ and NM carried out experiments, interpreted data and contributed to writing the manuscript; RG, HM and JR carried out experiments; SFB and ND designed experiments and interpreted data; LPB and JLG reviewed the manuscript; FN supervised the study and wrote the manuscript; All authors read and approved the final manuscript

Acknowledgements: not applicable

Author's Information: not applicable

References

1. Bedford MT, Clarke SG: **Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why.** *Mol Cell* 2009, **33**:1-13.
2. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR: **Regulation of transcription by a protein methyltransferase.** *Science* 1999, **284**:2174-2177.
3. Feng Q, Yi P, Wong J, O'Malley BW: **Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:7846-7857.
4. Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM: **A transcriptional switch mediated by cofactor methylation.** *Science* 2001, **294**:2507-2511.
5. Tang J, Kao PN, Herschman HR: **Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3.** *J Biol Chem* 2000, **275**:19866-19876.
6. Barrero MJ, Malik S: **Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation.** *Mol Cell* 2006, **24**:233-243.
7. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L: **Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1.** *Mol Cell* 2008, **31**:212-221.
8. Chiou YY, Lin WJ, Fu SL, Lin CH: **Direct mass-spectrometric identification of Arg296 and Arg299 as the methylation sites of hnRNP K protein for methyltransferase PRMT1.** *Protein J* 2007, **26**:87-93.
9. Liu Q, Dreyfuss G: **In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:2800-2808.
10. Kleinschmidt MA, Streubel G, Samans B, Krause M, Bauer UM: **The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:3202-3213.
11. Ou CY, LaBonte MJ, Manegold PC, So AY, Ianculescu I, Gerke DS, Yamamoto KR, Ladner RD, Kahn M, Kim JH, Stallcup MR: **A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of beta-catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression.** *Mol Cancer Res* 2011, **9**:660-670.
12. Kim YR, Lee BK, Park RY, Nguyen NT, Bae JA, Kwon DD, Jung C: **Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers.** *BMC Cancer* 2010, **10**:197.
13. Davis MB, Liu X, Wang S, Reeves J, Khramtsov A, Huo D, Olopade OI: **Expression and sub-cellular localization of an epigenetic regulator, co-activator arginine methyltransferase 1 (CARM1), is associated with specific breast cancer subtypes and ethnicity.** *Mol Cancer* 2013, **12**:40.
14. Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Kelly JD, Neal DE, Maehara Y, Ponder BA, et al: **Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers.** *Int J Cancer* 2011, **128**:562-573.

15. Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M: **Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo.** *Nature* 2007, **445**:214-218.
16. Wu Q, Bruce AW, Jedrusik A, Ellis PD, Andrews RM, Langford CF, Glover DM, Zernicka-Goetz M: **CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation.** *Stem Cells* 2009, **27**:2637-2645.
17. Troffer-Charlier N, Cura V, Hassenboehler P, Moras D, Cavarelli J: **Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains.** *EMBO J* 2007, **26**:4391-4401.
18. Zhang X, Cheng X: **Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides.** *Structure* 2003, **11**:509-520.
19. Zhang X, Zhou L, Cheng X: **Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3.** *EMBO J* 2000, **19**:3509-3519.
20. Weiss VH, McBride AE, Soriano MA, Filman DJ, Silver PA, Hogle JM: **The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1.** *Nat Struct Biol* 2000, **7**:1165-1171.
21. Yue WW, Hassler M, Roe SM, Thompson-Vale V, Pearl LH: **Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase.** *EMBO J* 2007, **26**:4402-4412.
22. Zhou P, Tian F, Shang Z: **2D depiction of nonbonding interactions for protein complexes.** *J Comput Chem* 2009, **30**:940-951.
23. Thomas D, Lakowski TM, Pak ML, Kim JJ, Frankel A: **Forster resonance energy transfer measurements of cofactor-dependent effects on protein arginine N-methyltransferase homodimerization.** *Protein Sci* 2010, **19**:2141-2151.
24. Pak ML, Lakowski TM, Thomas D, Vhuiyan MI, Husecken K, Frankel A: **A protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) and 2 heteromeric interaction increases PRMT1 enzymatic activity.** *Biochemistry* 2011, **50**:8226-8240.
25. Higashimoto K, Kuhn P, Desai D, Cheng X, Xu W: **Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:12318-12323.
26. Huysmans M, Richelle J, Wodak SJ: **SESAM: a relational database for structure and sequence of macromolecules.** *Proteins* 1991, **11**:59-76.
27. Kozakov D, Hall DR, Beglov D, Brenke R, Comeau SR, Shen Y, Li K, Zheng J, Vakili P, Paschalidis I, Vajda S: **Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19.** *Proteins* 2010, **78**:3124-3130.
28. Feng Q, He B, Jung SY, Song Y, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: **Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation.** *J Biol Chem* 2009, **284**:36167-36174.
29. Herrmann F, Pably P, Eckerich C, Bedford MT, Fackelmayer FO: **Human protein arginine methyltransferases in vivo--distinct properties of eight canonical members of the PRMT family.** *J Cell Sci* 2009, **122**:667-677.
30. Goulet I, Gauvin G, Boisvenue S, Cote J: **Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization.** *J Biol Chem* 2007, **282**:33009-33021.

31. Carascossa S, Dudek P, Cenni B, Briand PA, Picard D: **CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP.** *Genes Dev* 2010, **24**:708-719.

Liste des références

Adolphe, C., Narang, M., Ellis, T., Wicking, C., Kaur, P., and Wainwright, B. (2004). An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog reveals that hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. *Development (Cambridge, England)* *131*, 5009-5019.

Aguilo, F., Zhang, F., Sancho, A., Fidalgo, M., Di Cecilia, S., Vashisht, A., Lee, D.-F., Chen, C.-H., Rengasamy, M., and Andino, B. (2015). Coordination of m 6 A mRNA methylation and gene transcription by ZFP217 regulates pluripotency and reprogramming. *Cell stem cell* *17*, 689-704.

Akbulut, S., Altiparmak, E., Topal, F., Ozaslan, E., Kucukazman, M., and Yonem, O. (2010). Increased levels of homocysteine in patients with ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology* *16*, 2411-2416.

Aken, B.L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., and Hourlier, T. (2016). The Ensembl gene annotation system. *Database* *2016*.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3983-3988.

Allen, M.D., Luong, P., Hudson, C., Leyton, J., Delage, B., Ghazaly, E., Cutts, R., Yuan, M., Syed, N., and Nigro, C.L. (2014). Prognostic and therapeutic impact of argininosuccinate synthetase 1 control in bladder cancer as monitored longitudinally by PET imaging. *Cancer research* *74*, 896-907.

Allen, R.H., Stabler, S.P., Savage, D.G., and Lindenbaum, J. (1990). Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *American journal of hematology* *34*, 90-98.

Andres, E., Loukili, N.H., Noel, E., Kaltenbach, G., Abdelgheni, M.B., Perrin, A.E., Noblet-Dick, M., Maloisel, F., Schlienger, J.L., and Blickle, J.F. (2004). Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* *171*, 251-259.

Angier, R.B., Boothe, J.H., Hutchings, B.L., Mowat, J.H., Semb, J., Stokstad, E.L., Subbarow, Y., Waller, C.W., Cosulich, D.B., Fahrenbach, M.J., *et al.* (1946). The Structure and Synthesis of the Liver L. casei Factor. *Science* *103*, 667-669.

Aryee, M.J., Jaffe, A.E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A.P., Hansen, K.D., and Irizarry, R.A. (2014). Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* *30*, 1363-1369.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., and Eppig, J.T. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* *25*, 25.

- Assantachai, P., and Lekhakula, S. (2007). Epidemiological survey of vitamin deficiencies in older Thai adults: implications for national policy planning. *Public health nutrition* 10, 65-70.
- Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L.C., and Holttä, E. (1992). Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360, 355-358.
- Avila, M.A., Garcia-Trevijano, E.R., Martinez-Chantar, M.L., Latasa, M.U., Perez-Mato, I., Martinez-Cruz, L.A., del Pino, M.M., Corrales, F.J., and Mato, J.M. (2002). S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol (Fayetteville, NY)* 27, 163-167.
- Backlund, P.S., Jr., Chang, C.P., and Smith, R.A. (1982). Identification of 2-keto-4-methylthiobutyrate as an intermediate compound in methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine. *J Biol Chem* 257, 4196-4202.
- Backlund, P.S., Jr., and Smith, R.A. (1981). Methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine in rat liver. *J Biol Chem* 256, 1533-1535.
- Baggetto, L. (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 74, 959-974.
- Bailey, L.B., Wagner, P.A., Christakis, G.J., Davis, C.G., Appledorf, H., Araujo, P.E., Dorsey, E., and Dinning, J.S. (1982). Folic acid and iron status and hematological findings in black and Spanish-American adolescents from urban low-income households. *The American journal of clinical nutrition* 35, 1023-1032.
- Balamurugan, K., and Said, H.M. (2006). Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake. *American journal of physiology Cell physiology* 291, C189-193.
- Ballestar, E., Paz, M.F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M.F., Espada, J., Cigudosa, J.C., Huang, T.H., and Esteller, M. (2003). Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *Embo j* 22, 6335-6345.
- Barrero, M.J., and Malik, S. (2006). Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation. *Mol Cell* 24, 233-243.
- Basu, I., Locker, J., Cassera, M.B., Belbin, T.J., Merino, E.F., Dong, X., Hemeon, I., Evans, G.B., Guha, C., and Schramm, V.L. (2011). Growth and metastases of human lung cancer are inhibited in mouse xenografts by a transition state analogue of 5'-methylthioadenosine phosphorylase. *J Biol Chem* 286, 4902-4911.
- Bates, M.N., Smith, A.H., and Hopenhayn-Rich, C. (1992). Arsenic ingestion and internal cancers: a review. *American journal of epidemiology* 135, 462-476.
- Batova, A., Diccianni, M.B., Omura-Minamisawa, M., Yu, J., Carrera, C.J., Bridgeman, L.J., Kung, F.H., Pullen, J., Amylon, M.D., and Yu, A.L. (1999). Use of alanosine as a methylthioadenosine phosphorylase-selective therapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia in vitro. *Cancer research* 59, 1492-1497.

Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33, 1-13.

Beetstra, S., Suthers, G., Dhillon, V., Salisbury, C., Turner, J., Altree, M., McKinnon, R., and Fenech, M. (2008). Methionine-dependence phenotype in the de novo pathway in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with and without breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 17, 2565-2571.

Behrmann, I., Wallner, S., Komyod, W., Heinrich, P.C., Schuierer, M., Buettner, R., and Bosserhoff, A.K. (2003). Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *The American journal of pathology* 163, 683-690.

Benavides, M.A., Bosland, M.C., da Silva, C.P., Gomes Sares, C.T., de Oliveira, A.M., Kemp, R., dos Reis, R.B., Martins, V.R., Sampaio, S.V., Bland, K.I., *et al.* (2014). L-Methionine inhibits growth of human pancreatic cancer cells. *Anti-cancer drugs* 25, 200-203.

Benavides, M.A., Hagen, K.L., Fang, W., Du, P., Lin, S., Moyer, M.P., Yang, W., Bland, K.I., Grizzle, W.E., and Bosland, M.C. (2010). Suppression by L-methionine of cell cycle progression in LNCaP and MCF-7 cells but not benign cells. *Anticancer research* 30, 1881-1885.

Benavides, M.A., Hu, D., Baraoidan, M.K., Bruno, A., Du, P., Lin, S., Yang, W., Bland, K.I., Grizzle, W.E., and Bosland, M.C. (2011). L-methionine-induced alterations in molecular signatures in MCF-7 and LNCaP cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology* 137, 441-453.

Benavides, M.A., Oelschlager, D.K., Zhang, H.G., Stockard, C.R., Vital-Reyes, V.S., Katkoori, V.R., Manne, U., Wang, W., Bland, K.I., and Grizzle, W.E. (2007). Methionine inhibits cellular growth dependent on the p53 status of cells. *American journal of surgery* 193, 274-283.

Bialostosky, K., Wright, J.D., Kennedy-Stephenson, J., McDowell, M., and Johnson, C.L. (2002). Dietary intake of macronutrients, micronutrients, and other dietary constituents: United States 1988-94. *Vital and health statistics Series 11, Data from the national health survey*, 1-158.

Biancotto, C., Frige, G., and Minucci, S. (2010). Histone modification therapy of cancer. *Advances in genetics* 70, 341-386.

Billings, R.E., Noker, P.E., and Tephly, T.R. (1981). The role of methionine in regulating folate-dependent reactions in isolated rat hepatocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 208, 108-120.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 730-737.

Borovski, T., De Sousa, E.M.F., Vermeulen, L., and Medema, J.P. (2011). Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer research* 71, 634-639.

Bosson, G. (2003). Reduced folate carrier: biochemistry and molecular biology of the normal and methotrexate-resistant cell. *British journal of biomedical science* 60, 117-129.

Brat, D.J., James, C.D., Jedlicka, A.E., Connolly, D.C., Chang, E., Castellani, R.J., Schmid, M., Schiller, M., Carson, D.A., and Burger, P.C. (1999). Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas. *The American journal of pathology* 154, 1431-1438.

Bruce, W.R., and Van Der Gaag, H. (1963). A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 199, 79-80.

Brzezinska, A., Winska, P., and Balinska, M. (2000). Cellular aspects of folate and antifolate membrane transport. *Acta biochimica Polonica* 47, 735-749.

Buch, L., Streeter, D., Halpern, R.M., Simon, L.N., Stout, M.G., and Smith, R.A. (1972). Inhibition of transfer ribonucleic acid methylase activity from several human tumors by nicotinamide and nicotinamide analogs. *Biochemistry* 11, 393-397.

Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H., and Smith, A. (1999). Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells, tissues, organs* 165, 131-143.

Butterworth, C.E., Jr. (1993). Folate status, women's health, pregnancy outcome, and cancer. *Journal of the American College of Nutrition* 12, 438-441.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 11, 85-95.

Cao, W.X., Ou, J.M., Fei, X.F., Zhu, Z.G., Yin, H.R., Yan, M., and Lin, Y.Z. (2002). Methionine-dependence and combination chemotherapy on human gastric cancer cells in vitro. *World journal of gastroenterology* 8, 230-232.

Carascossa, S., Dudek, P., Cenni, B., Briand, P.A., and Picard, D. (2010). CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes Dev* 24, 708-719.

Cavuoto, P., and Fenech, M.F. (2012). A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer treatment reviews* 38, 726-736.

Chakrabarti, G., Gerber, D.E., and Boothman, D.A. (2015). Expanding antitumor therapeutic windows by targeting cancer-specific nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-biogenesis pathways. *Clinical pharmacology : advances and applications* 7, 57-68.

Chandler, C.J., Harrison, D.A., Buffington, C.A., Santiago, N.A., and Halsted, C.H. (1991). Functional specificity of jejunal brush-border pteroylpolyglutamate hydrolase in pig. *The American journal of physiology* 260, G865-872.

Chandler, C.J., Wang, T.T., and Halsted, C.H. (1986). Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. *J Biol Chem* 261, 928-933.

- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W., and Stallcup, M.R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177.
- Chen, K., Huang, Y.H., and Chen, J.L. (2013). Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta pharmacologica Sinica* 34, 732-740.
- Chen, Z., and Banerjee, R. (1998). Purification of soluble cytochrome b5 as a component of the reductive activation of porcine methionine synthase. *J Biol Chem* 273, 26248-26255.
- Chiou, Y.Y., Lin, W.J., Fu, S.L., and Lin, C.H. (2007). Direct mass-spectrometric identification of Arg296 and Arg299 as the methylation sites of hnRNP K protein for methyltransferase PRMT1. *Protein J* 26, 87-93.
- Cho, W., Choi, J., Park, C.H., Yoon, S.O., Jeoung, D.I., Kim, Y.M., and Choe, J. (2008). Expression of CD320 in human B cells in addition to follicular dendritic cells. *BMB reports* 41, 863-867.
- Christopher, S.A., Diegelman, P., Porter, C.W., and Kruger, W.D. (2002). Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer research* 62, 6639-6644.
- Chung, E.J., Hwang, S.-G., Nguyen, P., Lee, S., Kim, J.-S., Kim, J.W., Henkart, P.A., Bottaro, D.P., Soon, L., and Bonvini, P. (2002). Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by β -catenin. *Blood* 100, 982-990.
- Clarke, R., Smith, A.D., Jobst, K.A., Refsum, H., Sutton, L., and Ueland, P.M. (1998). Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Archives of neurology* 55, 1449-1455.
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine* 17, 313-319.
- Coalson, D.W., Mecham, J.O., Stern, P.H., and Hoffman, R.M. (1982). Reduced availability of endogenously synthesized methionine for S-adenosylmethionine formation in methionine-dependent cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4248-4251.
- Coelho, D., Kim, J.C., Miousse, I.R., Fung, S., du Moulin, M., Buers, I., Suormala, T., Burda, P., Frapolli, M., Stucki, M., *et al.* (2012). Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nature genetics* 44, 1152-1155.
- Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., Lerner-Ellis, J.P., Rosenblatt, D.S., Newbold, R.F., Baumgartner, M.R., and Fowler, B. (2008). Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *The New England journal of medicine* 358, 1454-1464.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* 65, 10946-10951.

- Collins, T.D., Eisenga, B.H., Bhandari, S.D., and McMartin, K.E. (1992). Effects of ethanol on tissue folate incorporation and recovery from folate deficiency in rats. *Alcoholism, clinical and experimental research* 16, 757-763.
- Cornell, K.A., Winter, R.W., Tower, P.A., and Riscoe, M.K. (1996). Affinity purification of 5-methylthioribose kinase and 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase from *Klebsiella pneumoniae* [corrected]. *The Biochemical journal* 317 (Pt 1), 285-290.
- Damjanov, I. (2005). The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem cell reviews* 1, 273-276.
- Damjanov, I., and Solter, D. (1976). Animal model of human disease: teratoma and teratocarcinoma. *The American journal of pathology* 83, 241.
- Dante, R., Arnaud, M., and Niveleau, A. (1983). Effects of 5'deoxy-5'-methylthioadenosine on the metabolism of S-adenosyl methionine. *Biochemical and biophysical research communications* 114, 214-221.
- Davis, M.B., Liu, X., Wang, S., Reeves, J., Khramtsov, A., Huo, D., and Olopade, O.I. (2013). Expression and sub-cellular localization of an epigenetic regulator, co-activator arginine methyltransferase 1 (CARM1), is associated with specific breast cancer subtypes and ethnicity. *Mol Cancer* 12, 40.
- Day, P.L., Langston, W.C., and Shukers, C.F. (1935). Leukopenia and inania in the monkey resulting from vitamin deficiency. *Journal of Nutrition* 9, 637-644.
- de Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J., and Miyano, S. (2004). Open source clustering software. *Bioinformatics* 20, 1453-1454.
- De Wals, P., Tairou, F., Van Allen, M.I., Uh, S.H., Lowry, R.B., Sibbald, B., Evans, J.A., Van den Hof, M.C., Zimmer, P., Crowley, M., *et al.* (2007). Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *The New England journal of medicine* 357, 135-142.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews Cancer* 5, 275-284.
- DeBerardinis, R.J. (2011). Serine metabolism: some tumors take the road less traveled. *Cell metabolism* 14, 285-286.
- Demuth, K., Atger, V., Borderie, D., Benoit, M.O., Sauvaget, D., Lotersztajn, S., and Moatti, N. (1999). Homocysteine decreases endothelin-1 production by cultured human endothelial cells. *European journal of biochemistry* 263, 367-376.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Dietrich, M., Brown, C.J., and Block, G. (2005). The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *Journal of the American College of Nutrition* 24, 266-274.

- Donaldson, K.O., and Keresztesy, J.C. (1962). Naturally occurring forms of folic acid. III. Characterization and properties of 5-methyldihydrofolate, an oxidation product of 5-methyltetrahydrofolate. *J Biol Chem* 237, 3815-3819.
- Drennan, C.L., Huang, S., Drummond, J.T., Matthews, R.G., and Lidwig, M.L. (1994). How a protein binds B12: A 3.0 Å X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase. *Science* 266, 1669-1674.
- Dringen, R., and Hamprecht, B. (1999). N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neuroscience letters* 259, 79-82.
- Drost, H.-G., and Paszkowski, J. (2017). Biomart: genomic data retrieval with R. *Bioinformatics* 33, 1216-1217.
- Duncan, T.M., Reed, M.C., and Nijhout, H.F. (2013). The relationship between intracellular and plasma levels of folate and metabolites in the methionine cycle: a model. *Molecular nutrition & food research* 57, 628-636.
- Dykstra, W.G., Jr., and Herbst, E.J. (1965). Spermidine in Regenerating Liver: Relation to Rapid Synthesis of Ribonucleic Acid. *Science* 149, 428-429.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation* 15, 504-514.
- Fan, J., Ye, J., Kamphorst, J.J., Shlomi, T., Thompson, C.B., and Rabinowitz, J.D. (2014). Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* 510, 298-302.
- Fang, J.Y., Xiao, S.D., Zhu, S.S., Yuan, J.M., Qiu, D.K., and Jiang, S.J. (1997). Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. *Journal of gastroenterology* 32, 171-175.
- Farber, S., Cutler, E.C., Hawkins, J.W., Harrison, J.H., Peirce, E.C., 2nd, and Lenz, G.G. (1947). The Action of Pteroylglutamic Conjugates on Man. *Science* 106, 619-621.
- Farber, S., and Diamond, L.K. (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *The New England journal of medicine* 238, 787-793.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews Genetics* 7, 21-33.
- Feinberg, A.P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. In *Nature reviews Cancer (England)*, pp. 143-153.
- Feng, Q., He, B., Jung, S.Y., Song, Y., Qin, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (2009). Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *J Biol Chem* 284, 36167-36174.

- Feng, Q., Yi, P., Wong, J., and O'Malley, B.W. (2006). Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol* 26, 7846-7857.
- Fernandes-Costa, F., and Metz, J. (1982). Vitamin B12 binders (transcobalamins) in serum. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 18, 1-30.
- Fernandez-Arroyo, S., Cuyas, E., Bosch-Barrera, J., Alarcon, T., Joven, J., and Menendez, J.A. (2015). Activation of the methylation cycle in cells reprogrammed into a stem cell-like state. *Oncoscience* 2, 958-967.
- Ferro, A.J., Vandenberg, A.A., and MacDonald, M.R. (1981). Inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochemical and biophysical research communications* 100, 523-531.
- Fialkow, P.J., Gartler, S.M., and Yoshida, A. (1967). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58, 1468-1471.
- Fialkow, P.J., Jacobson, R.J., and Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *The American journal of medicine* 63, 125-130.
- Fillingame, R.H., and Morris, D.R. (1973). Polyamine accumulation during lymphocyte transformation and its relation to the synthesis, processing, and accumulation of ribonucleic acid. *Biochemistry* 12, 4479-4487.
- Finkelstein, J.D. (1998). The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *European journal of pediatrics* 157 Suppl 2, S40-44.
- Finkelstein, J.D. (2007). Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 45, 1694-1699.
- Finkelstein, J.D., Kyle, W.E., and Harris, B.J. (1974). Methionine metabolism in mammals: regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. *Archives of biochemistry and biophysics* 165, 774-779.
- Finkelstein, J.D., and Martin, J.J. (1984). Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochemical and biophysical research communications* 118, 14-19.
- Finkelstein, J.D., and Martin, J.J. (2000). Homocysteine. *The international journal of biochemistry & cell biology* 32, 385-389.
- Fiskerstrand, T., Christensen, B., Tysnes, O.B., Ueland, P.M., and Refsum, H. (1994). Development and reversion of methionine dependence in a human glioma cell line: relation to homocysteine remethylation and cobalamin status. *Cancer research* 54, 4899-4906.
- Fiúza, U.-M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *Journal of Endocrinology* 194, 459-474.

Fortin, J.-P., Labbe, A., Lemire, M., Zanke, B.W., Hudson, T.J., Fertig, E.J., Greenwood, C.M., and Hansen, K.D. (2014). Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome biology* 15, 503.

Fox, I.H., Palella, T.D., Thompson, D., and Herring, C. (1982). Adenosine metabolism: modification by S-adenosylhomocysteine and 5'-methylthioadenosine. *Archives of biochemistry and biophysics* 215, 302-308.

Fraga, M.F., and Esteller, M. (2005). Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 4, 1377-1381.

Furth, J., Kahn, M.C., and Breedis, C. (1937). The transmission of leukemia of mice with a single cell. *The American Journal of Cancer* 31, 276-282.

Gamble, M.V., Liu, X., Ahsan, H., Pilsner, J.R., Ilievski, V., Slavkovich, V., Parvez, F., Chen, Y., Levy, D., Factor-Litvak, P., *et al.* (2006). Folate and arsenic metabolism: a double-blind, placebo-controlled folic acid-supplementation trial in Bangladesh. *The American journal of clinical nutrition* 84, 1093-1101.

Gamble, M.V., Liu, X., Slavkovich, V., Pilsner, J.R., Ilievski, V., Factor-Litvak, P., Levy, D., Alam, S., Islam, M., Parvez, F., *et al.* (2007). Folic acid supplementation lowers blood arsenic. *The American journal of clinical nutrition* 86, 1202-1209.

Ganesan, T., Khadra, M.H., Wallis, J., and Neal, D.E. (2002). Vitamin B12 malabsorption following bladder reconstruction or diversion with bowel segments. *ANZ journal of surgery* 72, 479-482.

Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., *et al.* (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762-765.

Garcia-Castellano, J.M., Villanueva, A., Healey, J.H., Sowers, R., Cordon-Cardo, C., Huvos, A., Bertino, J.R., Meyers, P., and Gorlick, R. (2002). Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 782-787.

Gardner, D.K. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49, 83-102.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., and Liu, S. (2007a). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell* 1, 555-567.

Ginestier, C., Korkaya, H., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M.S., and Charafe-Jauffret, E. (2007b). La cellule souche cancéreuse-Un pilote aux commandes du cancer du sein. *médecine/sciences* 23, 1133-1140.

- Godfrey, P.S., Toone, B.K., Carney, M.W., Flynn, T.G., Bottiglieri, T., Laundry, M., Chanarin, I., and Reynolds, E.H. (1990). Enhancement of recovery from psychiatric illness by methylfolate. *Lancet* (London, England) *336*, 392-395.
- Goh, Y.I., and Koren, G. (2008). Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* *28*, 3-13.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *Journal of Experimental Medicine* *183*, 1797-1806.
- Goseki, N., Yamazaki, S., Shimojyu, K., Kando, F., Maruyama, M., Endo, M., Koike, M., and Takahashi, H. (1995). Synergistic effect of methionine-depleting total parenteral nutrition with 5-fluorouracil on human gastric cancer: a randomized, prospective clinical trial. *Japanese journal of cancer research : Gann* *86*, 484-489.
- Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine* *53*, 615-627.
- Gou, S., Liu, T., Wang, C., Yin, T., Li, K., Yang, M., and Zhou, J. (2007). Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties. *Pancreas* *34*, 429-435.
- Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S., and Cote, J. (2007). Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J Biol Chem* *282*, 33009-33021.
- Grasbeck, R., Simons, K., and Sinkkonen, I. (1965). Isolation of intrinsic factors from human gastric juice. *Acta chemica Scandinavica* *19*, 1777-1778.
- Green, J.M., Ballou, D.P., and Matthews, R.G. (1988). Examination of the role of methylenetetrahydrofolate reductase in incorporation of methyltetrahydrofolate into cellular metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *2*, 42-47.
- Grimwade, D., and Enver, T. (2004). Acute promyelocytic leukemia: where does it stem from? *Leukemia* *18*, 375-384.
- Grutzner, N., Heilmann, R.M., Stupka, K.C., Rangachari, V.R., Weber, K., Holzenburg, A., Suchodolski, J.S., and Steiner, J.M. (2013). Serum homocysteine and methylmalonic acid concentrations in Chinese Shar-Pei dogs with cobalamin deficiency. *Veterinary journal* (London, England : 1997) *197*, 420-426.
- Grzelakowska-Sztabert, B., and Landman-Balinska, M. (1976). Regulation of methionine synthetase in L-cells by vitamin B-12, folate and methionine. *Biochemical Society transactions* *4*, 922-925.

- Gueant, J.L., Gerard, A., Monin, B., Champigneulle, B., Gerard, H., and Nicolas, J.P. (1988). Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy. *Gut* 29, 1370-1378.
- Gueant, J.L., Gueant-Rodriguez, R.M., Anello, G., Bosco, P., Brunaud, L., Romano, C., Ferri, R., Romano, A., Candito, M., and Namour, B. (2003). Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clinical chemistry and laboratory medicine* 41, 1473-1477.
- Gueant, J.L., Namour, F., Gueant-Rodriguez, R.M., and Daval, J.L. (2013). Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 24, 279-289.
- Gulati, S., Brody, L.C., and Banerjee, R. (1999). Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochemical and biophysical research communications* 259, 436-442.
- Guo, H., Lishko, V.K., Herrera, H., Groce, A., Kubota, T., and Hoffman, R.M. (1993a). Therapeutic tumor-specific cell cycle block induced by methionine starvation in vivo. *Cancer research* 53, 5676-5679.
- Guo, H.Y., Herrera, H., Groce, A., and Hoffman, R.M. (1993b). Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer research* 53, 2479-2483.
- Gupta, R., Hamasaki-Katagiri, N., White Tabor, C., and Tabor, H. (2001). Effect of spermidine on the in vivo degradation of ornithine decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10620-10623.
- Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B.W., Garber, M., Grenier, J.K., Munson, G., Young, G., Lucas, A.B., Ach, R., and Bruhn, L. (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477, 295.
- Guzman, M.L., and Jordan, C.T. (2009). Lessons learned from the study of JunB: new insights for normal and leukemia stem cell biology. *Cancer cell* 15, 252-254.
- Guzman, M.L., Neering, S.J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D.S., Rizzieri, D.A., Luger, S.M., and Jordan, C.T. (2001). Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98, 2301-2307.
- Hadnagy, A., Gaboury, L., Beaulieu, R., and Balicki, D. (2006). SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental cell research* 312, 3701-3710.
- Halpern, B.C., Clark, B.R., Hardy, D.N., Halpern, R.M., and Smith, R.A. (1974). The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1133-1136.
- Han, J., Colditz, G.A., and Hunter, D.J. (2007). Polymorphisms in the MTHFR and VDR genes and skin cancer risk. *Carcinogenesis* 28, 390-397.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Harding, C.O., Arnold, G., Barness, L.A., Wolff, J.A., and Rosenblatt, D.S. (1997). Functional methionine synthase deficiency due to cblG disorder: a report of two patients and a review. *American journal of medical genetics* *71*, 384-390.
- Headstrom, P.D., Rulyak, S.J., and Lee, S.D. (2008). Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* *14*, 217-223.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 15178-15183.
- Henderson, G.B. (1990). Folate-binding proteins. *Annual review of nutrition* *10*, 319-335.
- Herrmann, F., Pably, P., Eckerich, C., Bedford, M.T., and Fackelmayer, F.O. (2009). Human protein arginine methyltransferases in vivo--distinct properties of eight canonical members of the PRMT family. *J Cell Sci* *122*, 667-677.
- Higashimoto, K., Kuhn, P., Desai, D., Cheng, X., and Xu, W. (2007). Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12318-12323.
- Hirata, F., Toyoshima, S., Axelrod, J., and Waxdal, M.J. (1980). Phospholipid methylation: a biochemical signal modulating lymphocyte mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 862-865.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A., Wulf, G., Nuchtern, J., Jax, T., Gobel, U., Goodell, M., and Brenner, M. (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14228-14233.
- Hoffman, D.R., Cornatzer, W.E., and Duerre, J.A. (1979). Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylations reactions. *Canadian journal of biochemistry* *57*, 56-65.
- Hoffman, R.M. (1982). Methionine dependence in cancer cells - a review. *In vitro* *18*, 421-428.
- Hoffman, R.M. (1985). Altered methionine metabolism and transmethylations in cancer. *Anticancer research* *5*, 1-30.
- Hoffman, R.M., and Erbe, R.W. (1976). High in vivo rates of methionine biosynthesis in transformed human and malignant rat cells auxotrophic for methionine. *Proc Natl Acad Sci U S A* *73*, 1523-1527.
- Hoffman, R.M., Jacobsen, S.J., and Erbe, R.W. (1978). Reversion to methionine independence by malignant rat and SV40-transformed human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* *82*, 228-234.

- Holliday, R., and Grigg, G.W. (1993). DNA methylation and mutation. *Mutation research* 285, 61-67.
- Honein, M.A., Paulozzi, L.J., Mathews, T.J., Erickson, J.D., and Wong, L.Y. (2001). Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama* 285, 2981-2986.
- Houlston, R.S., and Tomlinson, I.P. (2001). Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology* 121, 282-301.
- Hu, G., Tang, Q., Sharma, S., Yu, F., Escobar, T.M., Muljo, S.A., Zhu, J., and Zhao, K. (2013). Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. *Nature immunology* 14, 1190-1198.
- Huysmans, M., Richelle, J., and Wodak, S.J. (1991). SESAM: a relational database for structure and sequence of macromolecules. *Proteins* 11, 59-76.
- Ifergan, I., Jansen, G., and Assaraf, Y.G. (2008). The reduced folate carrier (RFC) is cytotoxic to cells under conditions of severe folate deprivation. RFC as a double edged sword in folate homeostasis. *J Biol Chem* 283, 20687-20695.
- Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193-206.
- Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference, I., its Panel on Folate, O.B.V., and Choline (1998). The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline* (Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.).
- Janossy, G., Greaves, M., Revesz, T., Lister, T., Roberts, M., Durrant, J., Kirk, B., Catovsky, D., and Beard, M. (1976). Blast crisis of chronic myeloid leukaemia (CML): II. Cell surface marker analysis of 'lymphoid' and myeloid cases. *British journal of haematology* 34, 179-192.
- Jaszewski, R., Misra, S., Tobi, M., Ullah, N., Naumoff, J.A., Kucuk, O., Levi, E., Axelrod, B.N., Patel, B.B., and Majumdar, A.P. (2008). Folic acid supplementation inhibits recurrence of colorectal adenomas: a randomized chemoprevention trial. *World journal of gastroenterology* 14, 4492-4498.
- Jiang, W., Nakayama, Y., Sequeira, J.M., and Quadros, E.V. (2013). Mapping the functional domains of TCbIR/CD320, the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 2988-2994.
- Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development* 23, 537-548.

- Judde, J.G., Ellis, M., and Frost, P. (1989). Biochemical analysis of the role of transmethylation in the methionine dependence of tumor cells. *Cancer research* 49, 4859-4865.
- Judde, J.G., and Frost, P. (1988). Patterns of methionine auxotrophy in normal and neoplastic cells: the methionine independence of lymphocyte mitogenesis and low frequency of the methionine-dependent phenotype in human tumors. *Cancer research* 48, 6775-6779.
- Jung, J., Kim, L.J., Wang, X., Wu, Q., Sanvoranart, T., Hubert, C.G., Prager, B.C., Wallace, L.C., Jin, X., and Mack, S.C. (2017). Nicotinamide metabolism regulates glioblastoma stem cell maintenance. *JCI insight* 2.
- Kalac, P. (2014). Health effects and occurrence of dietary polyamines: a review for the period 2005-mid 2013. *Food chemistry* 161, 27-39.
- Kalmbach, R.D., Choumenkovitch, S.F., Troen, A.M., D'Agostino, R., Jacques, P.F., and Selhub, J. (2008). Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. *The American journal of clinical nutrition* 88, 763-768.
- Kamei, T., Kohno, T., Ohwada, H., Takeuchi, Y., Hayashi, Y., and Fukuma, S. (1993). Experimental study of the therapeutic effects of folate, vitamin A, and vitamin B12 on squamous metaplasia of the bronchial epithelium. *Cancer* 71, 2477-2483.
- Kamely, D., Littlefield, J.W., and Erbe, R.W. (1973). Regulation of 5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase activity by methionine, vitamin B12, and folate in cultured baby hamster kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2585-2589.
- Kapadia, C.R. (1995). Vitamin B12 in health and disease: part I--inherited disorders of function, absorption, and transport. *The Gastroenterologist* 3, 329-344.
- Kenyon, S.H., Nicolaou, A., Ast, T., and Gibbons, W.A. (1996). Stimulation in vitro of vitamin B12-dependent methionine synthase by polyamines. *The Biochemical journal* 316 (Pt 2), 661-665.
- Kenyon, S.H., Waterfield, C.J., Timbrell, J.A., and Nicolaou, A. (2002). Methionine synthase activity and sulphur amino acid levels in the rat liver tumour cells HTC and Phi-1. *Biochemical pharmacology* 63, 381-391.
- Kilberg, M.S., Terada, N., and Shan, J. (2016). Influence of amino acid metabolism on embryonic stem cell function and differentiation. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 7, 780S-789S.
- Kile, M.L., and Ronnenberg, A.G. (2008). Can folate intake reduce arsenic toxicity? *Nutrition reviews* 66, 349-353.
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods* 12, 357-360.

- Kim, T.H., Yang, J., Darling, P.B., and O'Connor, D.L. (2004). A large pool of available folate exists in the large intestine of human infants and piglets. *The Journal of nutrition* *134*, 1389-1394.
- Kim, Y.I. (2007). Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Molecular nutrition & food research* *51*, 267-292.
- Kim, Y.I. (2008). Folic acid supplementation and cancer risk: point. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* *17*, 2220-2225.
- Kim, Y.R., Lee, B.K., Park, R.Y., Nguyen, N.T., Bae, J.A., Kwon, D.D., and Jung, C. (2010). Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers. *BMC Cancer* *10*, 197.
- Kindler, H.L., Burris, H.A., 3rd, Sandler, A.B., and Oliff, I.A. (2009). A phase II multicenter study of L-alanosine, a potent inhibitor of adenine biosynthesis, in patients with MTAP-deficient cancer. *Investigational new drugs* *27*, 75-81.
- Kleinschmidt, M.A., Streubel, G., Samans, B., Krause, M., and Bauer, U.M. (2008). The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nucleic Acids Res* *36*, 3202-3213.
- Kobayashi, H., and Choyke, P.L. (2010). Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: rational design and in vivo applications. *Accounts of chemical research* *44*, 83-90.
- Komatsu, A., Nagasaki, K., Fujimori, M., Amano, J., and Miki, Y. (2008). Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer. *International journal of oncology* *33*, 261-270.
- Kompis, I.M., Islam, K., and Then, R.L. (2005). DNA and RNA synthesis: antifolates. *Chemical reviews* *105*, 593-620.
- Kondo, T., Setoguchi, T., and Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 781-786.
- Kosovsky, M. (2012). Culture and Assay Systems Utilized for Cancer Stem Cell Research. bdbiosciences.com.
- Kouzarides, T. (2007). SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* *131*, 822.
- Kozakov, D., Hall, D.R., Beglov, D., Brenke, R., Comeau, S.R., Shen, Y., Li, K., Zheng, J., Vakili, P., Paschalidis, I., *et al.* (2010). Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19. *Proteins* *78*, 3124-3130.
- Krautler, B. (2005). Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochemical Society transactions* *33*, 806-810.

- Kredich, N.M., and Hershfield, M.S. (1979). S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2450-2454.
- Kredich, N.M., and Martin, D.V., Jr. (1977). Role of S-adenosylhomocysteine in adenosinemediated toxicity in cultured mouse T lymphoma cells. *Cell* 12, 931-938.
- Kubota, M., Kamatani, N., and Carson, D.A. (1983). Biochemical genetic analysis of the role of methylthioadenosine phosphorylase in a murine lymphoid cell line. *J Biol Chem* 258, 7288-7291.
- Kung, H.N., Marks, J.R., and Chi, J.T. (2011). Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS genetics* 7, e1002229.
- Kutzbach, C., and Stokstad, E.L. (1971). Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochimica et biophysica acta* 250, 459-477.
- Lamb, R., Harrison, H., Smith, D.L., Townsend, P.A., Jackson, T., Ozsvari, B., Martinez-Outschoorn, U.E., Pestell, R.G., Howell, A., Lisanti, M.P., *et al.* (2015). Targeting tumor-initiating cells: eliminating anabolic cancer stem cells with inhibitors of protein synthesis or by mimicking caloric restriction. *Oncotarget* 6, 4585-4601.
- Lander, A.D. (2009). The 'stem cell' concept: is it holding us back? *Journal of biology* 8, 70.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., and Smyth, G.K. (2014). Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome biology* 15, R29.
- Le Grusse, J., and Watier, B. (1993). Les vitamines: données biochimiques, nutritionnelles et cliniques (Centre d'Etude et d'Information sur les Vitamines (Roche)).
- Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31, 212-221.
- Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H.H., Rommens, J.M., Scherer, S.W., Rosenblatt, D.S., *et al.* (1998). Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3059-3064.
- Lee, D.Y., Teyssier, C., Strahl, B.D., and Stallcup, M.R. (2005). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocrine reviews* 26, 147-170.
- Lee, J.E., Willett, W.C., Fuchs, C.S., Smith-Warner, S.A., Wu, K., Ma, J., and Giovannucci, E. (2011). Folate intake and risk of colorectal cancer and adenoma: modification by time. *The American journal of clinical nutrition*, *ajcn*. 007781.

Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255-260.

Leuchtenberger, R., Leuchtenberger, C., Laszlo, D., and Lewisohn, R. (1945). THE INFLUENCE OF "FOLIC ACID" ON SPONTANEOUS BREAST CANCERS IN MICE. *Science* 101, 46.

Lewis, C.J., Crane, N.T., Wilson, D.B., and Yetley, E.A. (1999). Estimated folate intakes: data updated to reflect food fortification, increased bioavailability, and dietary supplement use. *The American journal of clinical nutrition* 70, 198-207.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* 67, 1030-1037.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.

Li, X., and Zhao, X. (2008). Epigenetic regulation of mammalian stem cells. *Stem cells and development* 17, 1043-1052.

Li, Y., and Littera, J. (2012). Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer research* 72, 576-580.

Lildballe, D.L., Mutti, E., Birn, H., and Nexø, E. (2012). Maximal load of the vitamin B12 transport system: a study on mice treated for four weeks with high-dose vitamin B12 or cobinamide. *PLoS one* 7, e46657.

Lim, U., Wang, S.S., Hartge, P., Cozen, W., Kelemen, L.E., Chanock, S., Davis, S., Blair, A., Schenk, M., Rothman, N., *et al.* (2007). Gene-nutrient interactions among determinants of folate and one-carbon metabolism on the risk of non-Hodgkin lymphoma: NCI-SEER case-control study. *Blood* 109, 3050-3059.

Linnebank, M., Fließbach, K., Kolsch, H., Rietschel, M., and Wullner, U. (2005). The methionine synthase polymorphism c.2756A>G (D919G) is relevant for disease-free longevity. *International journal of molecular medicine* 16, 759-761.

Liteplo, R.G., Hipwell, S.E., Rosenblatt, D.S., Sillaots, S., and Lue-Shing, H. (1991). Changes in cobalamin metabolism are associated with the altered methionine auxotrophy of highly growth autonomous human melanoma cells. *Journal of cellular physiology* 149, 332-338.

Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1995). In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 15, 2800-2808.

Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature reviews Cancer* 13, 572-583.

Loewy, A.D., Niles, K.M., Anastasio, N., Watkins, D., Lavoie, J., Lerner-Ellis, J.P., Pastinen, T., Trasler, J.M., and Rosenblatt, D.S. (2009). Epigenetic modification of the gene for the vitamin

B(12) chaperone MMACHC can result in increased tumorigenicity and methionine dependence. *Molecular genetics and metabolism* 96, 261-267.

Logan, R.F., Grainge, M.J., Shepherd, V.C., Armitage, N.C., and Muir, K.R. (2008). Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology* 134, 29-38.

Lonn, E., Yusuf, S., Arnold, M.J., Sheridan, P., Pogue, J., Micks, M., McQueen, M.J., Probstfield, J., Fodor, G., Held, C., *et al.* (2006). Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *The New England journal of medicine* 354, 1567-1577.

Lorenzi, P.L., Claerhout, S., Mills, G.B., and Weinstein, J.N. (2014). A curated census of autophagy-modulating proteins and small molecules: Candidate targets for cancer therapy. *Autophagy* 10, 1316-1326.

Lu, M., Wang, F., and Qiu, J. (2010). Methionine synthase A2756G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 18,953 subjects. *Breast cancer research and treatment* 123, 213-217.

Lu, S.C. (1998). Methionine adenosyltransferase and liver disease: it's all about SAM. In *Gastroenterology (United States)*, pp. 403-407.

Lubin, M., and Lubin, A. (2009). Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy. *PLoS one* 4, e5735.

Lucock, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism* 71, 121-138.

Lucock, M.D., Hartley, R., and Smithells, R.W. (1989). A rapid and specific HPLC-electrochemical method for the determination of endogenous 5-methyltetrahydrofolic acid in plasma using solid phase sample preparation with internal standardization. *Biomedical chromatography : BMC* 3, 58-63.

Lucock, M.D., Priestnall, M., Daskalakis, I., Schorah, C.J., Wild, J., and Levene, M.I. (1995). Nonenzymatic degradation and salvage of dietary folate: physicochemical factors likely to influence bioavailability. *Biochemical and molecular medicine* 55, 43-53.

Luo, W., and Brouwer, C. (2013). Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* 29, 1830-1831.

Luo, W., Friedman, M.S., Shedden, K., Hankenson, K.D., and Woolf, P.J. (2009). GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC bioinformatics* 10, 161.

M'Soka T, J., Nishioka, J., Taga, A., Kato, K., Kawasaki, H., Yamada, Y., Yu, A., Komada, Y., and Nobori, T. (2000). Detection of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) and p16 gene deletion in T cell acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR assay. *Leukemia* 14, 935-940.

Ma, E., Iwasaki, M., Junko, I., Hamada, G.S., Nishimoto, I.N., Carvalho, S.M., Motola, J., Jr., Laginha, F.M., and Tsubane, S. (2009). Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12,

genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer* 9, 122.

Martin, G.R., and Evans, M.J. (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 2, 163-172.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17, pp. 10-12.

Matherly, L.H., and Goldman, D.I. (2003). Membrane transport of folates. *Vitamins and hormones* 66, 403-456.

Mathieu, M.E., Faucheux, C., Saucourt, C., Soulet, F., Gauthereau, X., Fedou, S., Trouillas, M., Theze, N., Thiebaud, P., and Boeuf, H. (2013). MRAS GTPase is a novel stemness marker that impacts mouse embryonic stem cell plasticity and *Xenopus* embryonic cell fate. *Development (Cambridge, England)* 140, 3311-3322.

Mato, J.M., Alvarez, L., Ortiz, P., and Pajares, M.A. (1997). S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & therapeutics* 73, 265-280.

Matthews, J.H. (1998). The cytotoxic effect of the vitamin B12 inhibitor cyanocobalamin [c-lactam], and a review of other vitamin B12 antagonists. *Leukemia & lymphoma* 31, 21-37.

Matthews, R.G., and Baugh, C.M. (1980). Interactions of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase with methylenetetrahydropteroylpolyglutamate substrates and with dihydropteroylpolyglutamate inhibitors. *Biochemistry* 19, 2040-2045.

McDowell, L.R. (2000). Vitamin B12. *Vitamins in Animal and Human Nutrition, Second Edition*, 523-563.

Mecham, J.O., Rowitch, D., Wallace, C.D., Stern, P.H., and Hoffman, R.M. (1983). The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 117, 429-434.

Medema, J.P. (2013). Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nature cell biology* 15, 338-344.

Miki, K., Al-Refaie, W., Xu, M., Jiang, P., Tan, Y., Bouvet, M., Zhao, M., Gupta, A., Chishima, T., Shimada, H., *et al.* (2000). Methioninase gene therapy of human cancer cells is synergistic with recombinant methioninase treatment. *Cancer research* 60, 2696-2702.

Milunsky, A., Jick, H., Jick, S.S., Bruell, C.L., MacLaughlin, D.S., Rothman, K.J., and Willett, W. (1989). Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *Jama* 262, 2847-2852.

Minton, K. (2014). Stabilizing stemness through [m. sup. 6] A. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15.

Mintz, B., and Illmensee, K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 3585-3589.

Mitchell, H.K., Snell, E.E., and Williams, R.J. (1988). *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 63, 1941: The concentration of "folic acid" by Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell, and Roger J. Williams. *Nutrition reviews* 46, 324-325.

Moitra, K., Lou, H., and Dean, M. (2011). Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clinical pharmacology and therapeutics* 89, 491-502.

Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Irreverre, F., and Laster, L. (1964). HOMOCYSTINURIA: AN ENZYMATIC DEFECT. *Science* 143, 1443-1445.

Murphy, S.K., Yang, H., Moylan, C.A., Pang, H., Dellinger, A., Abdelmalek, M.F., Garrett, M.E., Ashley-Koch, A., Suzuki, A., and Tillmann, H.L. (2013). Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 145, 1076-1087.

Murray, J.A. (1999). The widening spectrum of celiac disease. *The American journal of clinical nutrition* 69, 354-365.

Nakai, Y., Inoue, K., Abe, N., Hatakeyama, M., Ohta, K.Y., Otagiri, M., Hayashi, Y., and Yuasa, H. (2007). Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 322, 469-476.

Nicolas, J.P., and Gueant, J.L. (1994). [Absorption, distribution and excretion of vitamin B12]. *Annales de gastroenterologie et d'hepatologie* 30, 270-276, 281; discussion 281-272.

Nielsen, M.J., Rasmussen, M.R., Andersen, C.B., Nexø, E., and Moestrup, S.K. (2012). Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 9, 345-354.

Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)* 134, 635-646.

Nobori, T., Karras, J.G., Della Ragione, F., Waltz, T.A., Chen, P.P., and Carson, D.A. (1991). Absence of methylthioadenosine phosphorylase in human gliomas. *Cancer research* 51, 3193-3197.

Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753-756.

Nobori, T., Takabayashi, K., Tran, P., Orvis, L., Batova, A., Yu, A.L., and Carson, D.A. (1996). Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6203-6208.

Olteanu, H., and Banerjee, R. (2001). Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* 276, 35558-35563.

Ou, C.Y., LaBonte, M.J., Manegold, P.C., So, A.Y., Ianculescu, I., Gerke, D.S., Yamamoto, K.R., Ladner, R.D., Kahn, M., Kim, J.H., *et al.* (2011). A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of beta-catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression. *Mol Cancer Res* 9, 660-670.

Ou, X., Yang, H., Ramani, K., Ara, A.I., Chen, H., Mato, J.M., and Lu, S.C. (2007). Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine. *The Biochemical journal* 401, 87-96.

Pak, M.L., Lakowski, T.M., Thomas, D., Vhuyian, M.I., Husecken, K., and Frankel, A. (2011). A protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) and 2 heteromeric interaction increases PRMT1 enzymatic activity. *Biochemistry* 50, 8226-8240.

Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., *et al.* (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344, 1396-1401.

Pegg, A.E. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer research* 48, 759-774.

Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.-C., Mendell, J.T., and Salzberg, S.L. (2015). StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature biotechnology* 33, 290-295.

Peters, T.J., Buckley, M.J., Statham, A.L., Pidsley, R., Samaras, K., Lord, R.V., Clark, S.J., and Molloy, P.L. (2015). De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics & chromatin* 8, 6.

Pissios, P. (2017). Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme. *Trends in Endocrinology & Metabolism*.

Poirson-Bichat, F., Goncalves, R.A., Miccoli, L., Dutrillaux, B., and Poupon, M.F. (2000). Methionine depletion enhances the antitumoral efficacy of cytotoxic agents in drug-resistant human tumor xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 643-653.

Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)* 110, 1001-1020.

Rafnsson, S.B., Saravanan, P., Bhopal, R.S., and Yajnik, C.S. (2011). Is a low blood level of vitamin B12 a cardiovascular and diabetes risk factor? A systematic review of cohort studies. *European journal of nutrition* 50, 97-106.

- Raiten, D.J., and Fisher, K.D. (1995). Assessment of folate methodology used in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1988-1994). *The Journal of nutrition* 125, 1371s-1398s.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843-850.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115.
- Rickes, E.L., Brink, N.G., Koniuszy, F.R., Wood, T.R., and Folkers, K. (1948). Crystalline Vitamin B12. *Science* 107, 396-397.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research* 43, e47-e47.
- Robinson, M.D., and Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology* 11, R25.
- Rosen, J.M., and Jordan, C.T. (2009). The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670-1673.
- Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M., and Grunstein, M. (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14503-14508.
- Russell-Jones, G.J., and Alpers, D.H. (1999). Vitamin B12 transporters. *Pharmaceutical biotechnology* 12, 493-520.
- Rutsch, F., Gailus, S., Miousse, I.R., Suormala, T., Sagne, C., Toliat, M.R., Nurnberg, G., Wittkamp, T., Buers, I., Sharifi, A., *et al.* (2009). Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nature genetics* 41, 234-239.
- Said, H.M., Chatterjee, N., Haq, R.U., Subramanian, V.S., Ortiz, A., Matherly, L.H., Sirotnak, F.M., Halsted, C., and Rubin, S.A. (2000). Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. *American journal of physiology Cell physiology* 279, C1889-1895.
- Said, H.M., Ghishan, F.K., and Redha, R. (1987). Folate transport by human intestinal brush-border membrane vesicles. *The American journal of physiology* 252, G229-236.

- Said, H.M., Ma, T.Y., Ortiz, A., Tapia, A., and Valerio, C.K. (1997). Intracellular regulation of intestinal folate uptake: studies with cultured IEC-6 epithelial cells. *The American journal of physiology* 272, C729-736.
- Said, H.M., and Redha, R. (1987). A carrier-mediated transport for folate in basolateral membrane vesicles of rat small intestine. *The Biochemical journal* 247, 141-146.
- Sanjoaquin, M.A., Allen, N., Couto, E., Roddam, A.W., and Key, T.J. (2005). Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer* 113, 825-828.
- Sawan, C., and Herceg, Z. (2010). Histone modifications and cancer. *Advances in genetics* 70, 57-85.
- Sawan, C., Vaissiere, T., Murr, R., and Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation research* 642, 1-13.
- Schmid, M., Malicki, D., Nobori, T., Rosenbach, M.D., Campbell, K., Carson, D.A., and Carrera, C.J. (1998). Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancers (NSCLC). *Oncogene* 17, 2669-2675.
- Scott, J., Rébeillé, F., and Fletcher, J. (2000). Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 795-824.
- Seetharam, B., Bose, S., and Li, N. (1999). Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). *The Journal of nutrition* 129, 1761-1764.
- Seetharam, B., and Li, N. (2000). Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitamins and hormones* 59, 337-366.
- Selhub, J., and Rosenberg, I.H. (1981). Folate transport in isolated brush border membrane vesicles from rat intestine. *J Biol Chem* 256, 4489-4493.
- Sell, S. (2010). On the stem cell origin of cancer. *The American journal of pathology* 176, 2584-2594.
- Sell, S., and Pierce, G.B. (1994). Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 70, 6-22.
- Shane, B. (1989). Folylpolylglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitamins and hormones* 45, 263-335.
- Sharp, L., and Little, J. (2004). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *American journal of epidemiology* 159, 423-443.
- Sheen, J.H., Zoncu, R., Kim, D., and Sabatini, D.M. (2011). Defective regulation of autophagy upon leucine deprivation reveals a targetable liability of human melanoma cells in vitro and in vivo. *Cancer cell* 19, 613-628.

- Shiraki, N., Shiraki, Y., Tsuyama, T., Obata, F., Miura, M., Nagae, G., Aburatani, H., Kume, K., Endo, F., and Kume, S. (2014). Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell metabolism* *19*, 780-794.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* *311*, 844-847.
- Shyh-Chang, N., Daley, G.Q., and Cantley, L.C. (2013a). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development (Cambridge, England)* *140*, 2535-2547.
- Shyh-Chang, N., Locasale, J.W., Lyssiotis, C.A., Zheng, Y., Teo, R.Y., Ratanasirintrawoot, S., Zhang, J., Onder, T., Unternaehrer, J.J., Zhu, H., *et al.* (2013b). Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. *Science* *339*, 222-226.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* *63*, 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396-401.
- Skibola, C.F., Smith, M.T., Kane, E., Roman, E., Rollinson, S., Cartwright, R.A., and Morgan, G. (1999). Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 12810-12815.
- Slattery, M.L., Potter, J.D., Samowitz, W., Schaffer, D., and Leppert, M. (1999). Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* *8*, 513-518.
- Smith, E.L. (1948). Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. *Nature* *161*, 638.
- Son, J., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., *et al.* (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* *496*, 101-105.
- Stabler, S.P., and Allen, R.H. (2004). Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annual review of nutrition* *24*, 299-326.
- Stern, P.H., and Hoffman, R.M. (1984). Elevated overall rates of transmethylated in cell lines from diverse human tumors. *In vitro* *20*, 663-670.
- Stern, P.H., and Hoffman, R.M. (1986). Enhanced in vitro selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect. *Journal of the National Cancer Institute* *76*, 629-639.

- Stern, P.H., Mecham, J.O., Wallace, C.D., and Hoffman, R.M. (1983). Reduced free-methionine in methionine-dependent SV40-transformed human fibroblasts synthesizing apparently normal amounts of methionine. *Journal of cellular physiology* *117*, 9-14.
- Stern, P.H., Wallace, C.D., and Hoffman, R.M. (1984). Altered methionine metabolism occurs in all members of a set of diverse human tumor cell lines. *Journal of cellular physiology* *119*, 29-34.
- Stokstad, E.L., and Koch, J. (1967). Folic acid metabolism. *Physiological reviews* *47*, 83-116.
- Stolzenberg-Solomon, R.Z., Pietinen, P., Barrett, M.J., Taylor, P.R., Virtamo, J., and Albanes, D. (2001). Dietary and other methyl-group availability factors and pancreatic cancer risk in a cohort of male smokers. *American journal of epidemiology* *153*, 680-687.
- Subhi, A.L., Diegelman, P., Porter, C.W., Tang, B., Lu, Z.J., Markham, G.D., and Kruger, W.D. (2003). Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites. *J Biol Chem* *278*, 49868-49873.
- Suganuma, T., and Workman, J.L. (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* *135*, 604-607.
- Sugimura, T., Birnbaum, S.M., Winitz, M., and Greenstein, J.P. (1959). Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. IX. Further studies on d-glucosaminecontaining diets. *Archives of biochemistry and biophysics* *83*, 521-527.
- Taipale, J., and Beachy, P.A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* *411*, 349-354.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Takakura, T., Takimoto, A., Notsu, Y., Yoshida, H., Ito, T., Nagatome, H., Ohno, M., Kobayashi, Y., Yoshioka, T., Inagaki, K., *et al.* (2006). Physicochemical and pharmacokinetic characterization of highly potent recombinant L-methionine gamma-lyase conjugated with polyethylene glycol as an antitumor agent. *Cancer research* *66*, 2807-2814.
- Tan, Y., Sun, X., Xu, M., Tan, X., Sasson, A., Rashidi, B., Han, Q., Wang, X., An, Z., Sun, F.X., *et al.* (1999). Efficacy of recombinant methioninase in combination with cisplatin on human colon tumors in nude mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *5*, 2157-2163.
- Tan, Y., Zavala, J., Sr., Han, Q., Xu, M., Sun, X., Tan, X., Magana, R., Geller, J., and Hoffman, R.M. (1997). Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients. *Anticancer research* *17*, 3857-3860.

- Tan, Y., Zavala, J., Sr., Xu, M., Zavala, J., Jr., and Hoffman, R.M. (1996). Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients. *Anticancer research* *16*, 3937-3942.
- Tang, B., Li, Y.N., and Kruger, W.D. (2000a). Defects in methylthioadenosine phosphorylase are associated with but not responsible for methionine-dependent tumor cell growth. *Cancer research* *60*, 5543-5547.
- Tang, J., Kao, P.N., and Herschman, H.R. (2000b). Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J Biol Chem* *275*, 19866-19876.
- Tang, X., Keenan, M.M., Wu, J., Lin, C.A., Dubois, L., Thompson, J.W., Freedland, S.J., Murphy, S.K., and Chi, J.T. (2015). Comprehensive profiling of amino acid response uncovers unique methionine-deprived response dependent on intact creatine biosynthesis. *PLoS genetics* *11*, e1005158.
- Tautt, J.W., Anuszewska, E.L., and Kozirowska, J.H. (1982). Methionine regulation of N-5-methyltetrahydrofolate: homocysteine methyltransferase and its influence on the growth and protein synthesis in normal, neoplastic, and transformed cells in culture. *Journal of the National Cancer Institute* *69*, 9-14.
- Thomas, D., Becker, A., and Surdin-Kerjan, Y. (2000). Reverse methionine biosynthesis from S-adenosylmethionine in eukaryotic cells. *J Biol Chem* *275*, 40718-40724.
- Thomas, D., Lakowski, T.M., Pak, M.L., Kim, J.J., and Frankel, A. (2010). Forster resonance energy transfer measurements of cofactor-dependent effects on protein arginine N-methyltransferase homodimerization. *Protein Sci* *19*, 2141-2151.
- Timmerman, L.A., Holton, T., Yuneva, M., Louie, R.J., Padro, M., Daemen, A., Hu, M., Chan, D.A., Ethier, S.P., van 't Veer, L.J., *et al.* (2013). Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer cell* *24*, 450-465.
- Tisdale, M.J. (1980a). Changes in tRNA methyltransferase activity and cellular S-adenosylmethionine content following methionine deprivation. *Biochimica et biophysica acta* *609*, 296-305.
- Tisdale, M.J. (1980b). Methionine metabolism in Walker carcinosarcoma in vitro. *European journal of cancer* *16*, 407-414.
- Tisdale, M.J. (1983). Methionine synthesis from 5'-methylthioadenosine by tumour cells. *Biochemical pharmacology* *32*, 2915-2920.
- Torres-Padilla, M.E., Parfitt, D.E., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2007). Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* *445*, 214-218.

- Trackman, P.C., and Abeles, R.H. (1983). Methionine synthesis from 5'-S-Methylthioadenosine. Resolution of enzyme activities and identification of 1-phospho-5-S-methylthioribulose. *J Biol Chem* 258, 6717-6720.
- Troffer-Charlier, N., Cura, V., Hassenboehler, P., Moras, D., and Cavarelli, J. (2007). Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *EMBO J* 26, 4391-4401.
- Tsun, Z.Y., and Possemato, R. (2015). Amino acid management in cancer. *Seminars in cell & developmental biology* 43, 22-32.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725.
- Ulrey, C.L., Liu, L., Andrews, L.G., and Tollesbol, T.O. (2005). The impact of metabolism on DNA methylation. *Human molecular genetics* 14 *Spec No 1*, R139-147.
- Vinogradov, S., and Wei, X. (2012). Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (London, England)* 7, 597-615.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
- Wagner, C., Briggs, W.T., and Cook, R.J. (1985). Inhibition of glycine N-methyltransferase activity by folate derivatives: implications for regulation of methyl group metabolism. *Biochemical and biophysical research communications* 127, 746-752.
- Wagner, C., Decha-Umphai, W., and Corbin, J. (1989). Phosphorylation modulates the activity of glycine N-methyltransferase, a folate binding protein. In vitro phosphorylation is inhibited by the natural folate ligand. *J Biol Chem* 264, 9638-9642.
- Walker, L.M.S., and Hardy, J. (1976). Philadelphia chromosome in acute leukemia. Case report. *Cancer* 38, 1619-1624.
- Wang, J., Alexander, P., Wu, L., Hammer, R., Cleaver, O., and McKnight, S.L. (2009). Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science* 325, 435-439.
- Wang, T.T., Chandler, C.J., and Halsted, C.H. (1986). Intracellular pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal mucosa. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 261, 13551-13555.
- Wang, Y.J., Bailey, J.M., Rovira, M., and Leach, S.D. (2013). Sphere-forming assays for assessment of benign and malignant pancreatic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 980, 281-290.
- Waterland, R.A., and Michels, K.B. (2007). Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annual review of nutrition* 27, 363-388.

- Watkins, D. (1998). Cobalamin metabolism in methionine-dependent human tumour and leukemia cell lines. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale* 21, 151-158.
- Watkins, D., and Rosenblatt, D.S. (1989). Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *American journal of medical genetics* 34, 427-434.
- Watkins, D., and Rosenblatt, D.S. (2011). Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 157c, 33-44.
- Weidman, J.R., Dolinoy, D.C., Murphy, S.K., and Jirtle, R.L. (2007). Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 13, 9-16.
- Weiss, V.H., McBride, A.E., Soriano, M.A., Filman, D.J., Silver, P.A., and Hogle, J.M. (2000). The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat Struct Biol* 7, 1165-1171.
- Weitman, S.D., Weinberg, A.G., Coney, L.R., Zurawski, V.R., Jennings, D.S., and Kamen, B.A. (1992). Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer research* 52, 6708-6711.
- Welch, G.N., and Loscalzo, J. (1998). Homocysteine and atherothrombosis. *The New England journal of medicine* 338, 1042-1050.
- Williams-Ashman, H.G., Seidenfeld, J., and Galletti, P. (1982). Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochemical pharmacology* 31, 277-288.
- Willis, L. (1931). Treatment of Pernicious Anaemia of Pregnancy and Tropical Anaemia with Special Reference to yeast Extract as Curative Agent. *British Journal of Medecine* 1, p.1059-1064.
- Wobus, A.M., and Boheler, K.R. (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological reviews* 85, 635-678.
- Worm, J., and Guldberg, P. (2002). DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 31, 443-449.
- Wu, Q., Bruce, A.W., Jedrusik, A., Ellis, P.D., Andrews, R.M., Langford, C.F., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2009). CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation. *Stem Cells* 27, 2637-2645.
- Wutz, A. (2013). Epigenetic Regulation of Stem Cells. In *Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells (Springer)*, pp. 307-328.

- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B.M., Montminy, M., and Evans, R.M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* *294*, 2507-2511.
- Yamanishi, M., Vlasie, M., and Banerjee, R. (2005). Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? *Trends in biochemical sciences* *30*, 304-308.
- Yang, I.V., and Schwartz, D.A. (2011). Epigenetic control of gene expression in the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine* *183*, 1295-1301.
- Yang, M., and Vousden, K.H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nature reviews Cancer* *16*, 650-662.
- Yang, Z., Wang, J., Lu, Q., Xu, J., Kobayashi, Y., Takakura, T., Takimoto, A., Yoshioka, T., Lian, C., Chen, C., *et al.* (2004). PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates. *Cancer research* *64*, 6673-6678.
- Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Hayami, S., Unoki, M., Tsunoda, T., Field, H.I., Kelly, J.D., Neal, D.E., Maehara, Y., Ponder, B.A., *et al.* (2011). Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int J Cancer* *128*, 562-573.
- Yue, W.W., Hassler, M., Roe, S.M., Thompson-Vale, V., and Pearl, L.H. (2007). Insights into histone code syntax from structural and biochemical studies of CARM1 methyltransferase. *EMBO J* *26*, 4402-4412.
- Zeeberg, B.R., Feng, W., Wang, G., Wang, M.D., Fojo, A.T., Sunshine, M., Narasimhan, S., Kane, D.W., Reinhold, W.C., and Lababidi, S. (2003). GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome biology* *4*, R28.
- Zeng, H., Chen, Z.S., Belinsky, M.G., Rea, P.A., and Kruh, G.D. (2001). Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer research* *61*, 7225-7232.
- Zhang, S., Hunter, D.J., Hankinson, S.E., Giovannucci, E.L., Rosner, B.A., Colditz, G.A., Speizer, F.E., and Willett, W.C. (1999). A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *Jama* *281*, 1632-1637.
- Zhang, W.C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S., Soh, B.S., Sun, L.L., Tai, B.C., Nga, M.E., *et al.* (2012). Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* *148*, 259-272.
- Zhang, X., and Cheng, X. (2003). Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* *11*, 509-520.
- Zhang, X., Zhou, L., and Cheng, X. (2000). Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J* *19*, 3509-3519.
- Zhou, P., Tian, F., and Shang, Z. (2009). 2D depiction of nonbonding interactions for protein complexes. *J Comput Chem* *30*, 940-951.

Zou, K., Ouyang, Q., Li, H., and Zheng, J. (2017). A global characterization of the translational and transcriptional programs induced by methionine restriction through ribosome profiling and RNA-seq. *BMC genomics* *18*, 189.

Résumé : Certaines cellules cancéreuses sont méthionine dépendantes cependant les mécanismes de cette méthionine dépendance sont inconnus. Les cellules initiatrices de tumeur, qui représentent un faible pourcentage des cellules d'une tumeur, sont impliquées dans la récurrence du cancer, phénotypent les cellules souches cancéreuses et forment des sphéroïdes 3D ou «tumor spheres (TS)» dans des conditions de culture non adhérentes.

Nous montrons que, contrairement aux cellules monocouches adhérentes U251, les TS dérivées de cellules de glioblastome U251 ont besoin de méthionine exogène pour se développer. Cette méthionine-dépendance est caractérisée par une courbe en forme de cloche dans laquelle la croissance des TS est ralentie par des concentrations élevées de méthionine (> 0,01mM). Pendant la restriction en méthionine, le 5-méthyle-tétrahydrofolate restaure la formation des TS. Si les TS sont privées de méthionine pendant 24h, puis supplémentées en acide folique, elles présentent des concentrations d'isoformes des folates significativement inférieures à celles retrouvées dans les cellules adhérentes maintenues dans les mêmes conditions. Ceci suggère que le cycle des folates est réprimé dans les TS comparativement aux cellules adhérentes. L'annotation fonctionnelle des données ARN-Seq montre des changements nets dans plusieurs fonctions moléculaires et dévoile dans les TS un cycle cellulaire réduit, une augmentation du caractère « stemness » et une diminution du métabolisme des folates affectant particulièrement DHFR, SHMT et MTFHD. L'analyse du méthylome révèle des changements de méthylation dans le cycle cellulaire, la signature « stemness » et le cycle des folates, malgré des profils globaux de méthylation de l'ADN qui restent stables. Cependant, contrairement à la méthylation importante des promoteurs observée pour le cycle cellulaire et les gènes « stemness » (+ 25%), seuls 10 gènes du cycle des folates sur 139 gènes impliqués dans le métabolisme des mono-carbones sont significativement modifiés. En conclusion, un cycle des folates avec activité réduite fait partie de la reprogrammation métabolique qui déclenche la dédifférenciation en cellules souches cancéreuses et cette répression ne s'explique qu'en partie par la modification de méthylation des promoteurs.

Mots clés : Glioblastome, Méthionine dépendance, cycle des Folates, cellules souches cancéreuses.

Summary : Some cancer cells are methionine dependent however little is known about the mechanisms of this dependency. Tumor initiating cells are a rare population of cancer cells, implicated in disease recurrence, that phenocopy cancer stem cells and form 3D spheroids or 'tumor spheres (TS)' under non adherent conditions. We show that, unlike U251 adherent monolayer cells, TS derived from U251 glioblastoma cells need exogenous methionine to grow. This methionine dependency is characterized by a bell shape curve in which high methionine concentrations (>0.01mM) slow down TS growth. During methionine restriction, 5-methyltetrahydrofolate restores TS formation. When TS are deprived from methionine for 24h, then supplemented with folic acid, they exhibit lower levels of folate isoforms than adherent cells maintained in the same conditions, suggesting that folate cycle is repressed in TS relative to adherent cells. Functional annotation of the RNA-seq data shows clear changes in several molecular functions and reveals in TS a reduced cell cycle, an increased stemness and a diminished folate metabolism affecting particularly DHFR, SHMT and MTFHD. Methylome analysis shows methylation changes in cell cycle, stemness and folate cycle, despite global DNA methylation patterns remaining stable. However, unlike the important promoter methylation observed for cell cycle and stemness genes (+25%), only 10 folate cycle genes out of 139 genes involved in one-carbon metabolism are significantly altered. In conclusion, reduced folate cycle is part of the metabolic reprogramming triggering dedifferentiation into cancer stem cells and this repression is only partly explained by the alteration of promoter methylation.

Keywords: Glioblastoma, Methionine dependency, Folates cycle, cancer stem cells.