

2m11.2662.1

Université de Montréal

MÉTHÉNYLTÉTRAHYDROFOLATE SYNTHÉTASE HUMAINE:  
 DÉTECTION TISSULAIRE ET SENSIBILITÉ AU  
 5-FLUOROURACIL

Par Aline Mamo  
 Département de médecine  
 Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de  
 l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences  
 biomédicales

Juin, 1998

© Aline Mamo, 1998



1.6324-078

W

4

U58

1999

V. 011

Université de Montréal

METHYLTETRAHYDROFOLATE SYNTHESE HUMAINE  
DETECTION TISSULAIRE ET SENSIBILITE AU  
2-FLUOROURACIL

Par Aline Mann  
Département de médecine  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences  
biomédicales

juin 1998

© Aline Mann, 1998



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

MÉTHÉNYLTÉTRAHYDROFOLATE SYNTHÉTASE HUMAINE:  
DÉTECTION TISSULAIRE ET SENSIBILITÉ AU 5-FLUOROURACIL

Présenté par  
Aline Mamo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Richard Mon Jalen  
Jacques Jolivet  
Jacques Gali Jean

Mémoire accepté le 29.10.1998

## SOMMAIRE

Le 5-fluorouracil (5-FU) est un agent anticancéreux utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancers. Son métabolite actif le désoxyfluorouridine monophosphate (F-dUMP), forme avec la thymidylate synthase (TS) et le méthylènetétrahydrofolate ( $\text{CH}_2$ -THF) un complexe ternaire interférant avec la synthèse *de novo* de la thymidylate, la réplication de l'ADN et menant à la mort de la cellule cancéreuse. La stabilité du complexe dépend des niveaux endogènes de  $\text{CH}_2$ -THF produits par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) qui catalyse le transfert du groupe monocarboné  $\text{CH}_2$  de la sérine au tétrahydrofolate (THF). L'activité de la SHMT est contrôlée, en partie, par les niveaux intracellulaires de 5-formyltétrahydrofolate (5-CHO-THF). La méthényltétrahydrofolate synthétase (MTHFS) module les concentrations de 5-CHO-THF en le convertissant de façon irréversible en méthényltétrahydrofolate ( $\text{CH}^+$ -THF). La production du  $\text{CH}_2$ -THF et la cytotoxicité au 5-FU pourraient donc dépendre de l'activité de la MTHFS. Cette étude a donc pour objectifs d'étudier la distribution tissulaire et cellulaire de la MTHFS et la cytotoxicité au 5-FU suite à sa surexpression.

Les résultats d'immunodétection démontrent que la MTHFS est présente dans les tissus où le métabolisme des folates est très actif ainsi que les tissus riches en mitochondries de même que toutes les lignées cellulaires d'origine épithéliale testés. Les études de RT-PCR

ne démontrent aucune corrélation évidente entre les taux des messagers et des protéines.

La surexpression de la MTHFS dans une lignée cellulaire de neuroblastome potentialise d'environ 10,000 fois les effets cytotoxiques du 5-FU. Cet effet résulte d'une augmentation des taux de  $\text{CH}_2\text{-THF}$  chez ces transformés qui favorise la formation du complexe ternaire entre la TS, le F-dUMP et le  $\text{CH}_2\text{-THF}$  et entraîne la mort cellulaire. La cytotoxicité au 5-FU observée chez les mêmes transformés est abolie suite à l'ajout de concentrations saturantes de glycine. Par contre, la sérine ne parvient pas à augmenter la cytotoxicité observée. Ainsi, la cytotoxicité au 5-FU est régulée dans ces cellules par les concentrations de sérine, de glycine et du 5-CHO-THF. Physiologiquement, seules les concentrations intracellulaires du 5-CHO-THF pourraient être régulées par une surexpression de la MTHFS. La MTHFS représenterait, dans ces conditions, l'étape limitante dans la synthèse du  $\text{CH}_2\text{-THF}$  et pourrait avoir une incidence thérapeutique.

## TABLES DES MATIÈRES

<b>IDENTIFICATION DU JURY</b>	
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>i</b>
<b>TABLES DES MATIÈRES.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>ix</b>

### CHAPITRE PREMIER: INTRODUCTION

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
1.1. L'ACIDE FOLIQUE: .....	2
1.1.1. <i>Sa structure:</i> .....	2
1.1.2. <i>Interconversion des folates intracellulaires:</i> .....	6
1.1.2.1. <i>Le cycle de la sérine et de la glycine:</i> .....	6
1.1.2.2. <i>Le rôle régulateur du 5-méthyltétrahydrofolate et de la méthionine</i> .....	7
1.1.2.3. <i>Biosynthèse de l'acide thymidylique:</i> .....	8
1.1.2.4. <i>Biosynthèse des purines:</i> .....	9
1.2 LA MÉTHÉNYLTÉTRAHYDROFOLATE SYNTHÉTASE: ..13	
1.2.1. <i>Biochimie de la MTHFS:</i> .....	13
1.2.2. <i>Rôle physiologique du 5-CHO-THF:</i> .....	14
1.2.3. <i>Biologie moléculaire de la MTHFS:</i> .....	16
1.3. LE 5-FLUOROURACIL: .....	19

1.3.1. <i>Sa cible et son mécanisme:</i> .....	19
1.3.2. <i>Les paramètres affectant l'efficacité clinique du</i> <i>5-fluorouracil:</i> .....	20
1.3.2.1. <i>Métabolisme des folates:</i> .....	20
1.3.2.2. <i>La polyglutamylation:</i> .....	21
1.3.2.3. <i>La thymidylate synthase:</i> .....	23
1.4. INTÉRETS PHARMACOLOGIQUES DE LA MTHFS: .....	24
1.5. PROJET DE RECHERCHE: .....	26

## CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES:</b> .....	<b>29</b>
2.1. Quantification des ARNm de la MTHFS:.....	29
2.1.1. <i>Extraction des ARNs totaux des tissus:</i> .....	29
2.1.2. <i>Extraction des ARNs totaux des cellules:</i> .....	30
2.1.3. <i>Synthèse du brin d'ADN complémentaire:</i> .....	31
2.1.4. <i>Réactions de PCR:</i> .....	31
2.1.5. <i>Buvarpage Southern:</i> .....	33
2.2. Buvarpage Western:.....	34
2.2.1. <i>Extraction et dosage des protéines:</i> .....	34
2.2.2. <i>Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant:</i> .....	35
2.2.3. <i>Immunodétection:</i> .....	36
2.3. Courbes de cytotoxicité au 5-fluorouracil:.....	37
2.4. Analyse des dérivés monocarbonés de l'acide folique: .....	38

### CHAPITRE 3: RÉSULTATS

<b>3. RÉSULTATS:</b> .....	<b>41</b>
3.1. Quantification des différents isoformes de la MTHFS:.....	41
3.2. Patron d'expression de la protéine MTHFS:.....	42
3.3. Courbes de cytotoxicité au 5-FU: .....	46
3.4. Détection du complexe 5F-dUMP-TS-CH <sub>2</sub> -THF: .....	52

### CHAPITRE 4: DISCUSSION

<b>4. DISCUSSION:</b> .....	<b>56</b>
4.1. Patron d'expression de la protéine MTHFS:.....	56
4.1.1. <i>Expression de la MTHFS dans les tissus normaux:</i> .....	57
4.1.2. <i>Expression de la MTHFS dans les lignées cellulaires:</i> .....	58
4.2. Absence de corrélation entre les niveaux des messagers et des protéines: .....	59
4.3. Surexpression de la MTHFS et cytotoxicité au 5-FU:.....	61
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>65</b>



## **LISTE DES TABLEAUX**

### **Chapitre 1: Introduction**

Tableau I: État d'oxydation des unités monocarbonées des cofacteurs foliques.....	3
-----------------------------------------------------------------------------------	---

### **Chapitre 3: Résultats**

Tableau II: Analyse de l'activité enzymatique de la MTHFS dans les cellules 5Y, 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6.....	54
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tableau III: Analyse des concentrations de deux cofacteurs tétrahydrofolates dans les cellules 5Y, 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6.....	54
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1: Introduction

- Figure 1: acide ptéroylglutamique (acide folique).....5
- Figure 2: Résidus monocarbonés portés en N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup> ou entre N<sup>5</sup> et N<sup>10</sup> de l'acide tétrahydrofolique (THF).....5
- Figure 3: Voies métaboliques associées au métabolisme des unités monocarbonées.....10
- Figure 4: La formation de l'acide thymidilique dTMP.....11
- Figure 5: Les réactions catalysées par la phosphoribosylglycinamide formyltransférase (1) et la phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransférase (2).....12
- Figure 6: Les ADNs complémentaires de la MTHFS.....18

### Chapitre 3: Résultats

- Figure 7: Patron d'expression et de production de la MTHFS dans les tissus normaux humains.....44

- Figure 8: Patron d'expression en ARN messagers et en protéines des trois isoformes de la MTHFS dans les lignées cellulaires.....45
- Figure 9: Immunodétection de la MTHFS dans les cellules 5Y 5YMTHFS-4,5YMTHFS-6, MCF-7 et le foie humain.....48
- Figure 10: Les courbes de cytotoxicité au 5-FU dans les cellules 5Y, 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6.....49
- Figure 11: Immunodétection de la thymidylate synthase dans les cellules 5Y et 5YMTHFS-6.....53
- Figure 12: Effet de la glycine sur la cytotoxicité au 5-FU dans les cellules 5Y et 5YMTHFS-6.....50
- Figure 13: Effet de la sérine sur la cytotoxicité au 5-FU dans les cellules 5Y et 5YMTHFS-6.....51

## LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

A	alanine
$\alpha$	alpha
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AICAR	AICA-1-D-ribofuranose-5'-monophosphate
ARNt	acide ribonucléotide de transfert
ATP	adénosine-5'-triphosphate
$\beta$	bêta
C	cystéine
cm	centimètre
CH <sup>+</sup> -THF	méthényltétrahydrofolate
5,10-CH <sub>2</sub> -THF	5,10-méthylènetétrahydrofolate
5-CH <sub>3</sub> -THF	5-méthyltétrahydrofolate
10-CHO-THF	10-formyltétrahydrofolate
cpm	coups par minute
C <sub>1</sub> -THF synthase	10-formyltétrahydrofolate synthétase, méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase, méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase
dCTP	acide cytidylique
°C	degré celsius
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
DHF	dihydrofolate
DHFR	dihydrofolate réductase
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
dTMP	acide thymidylique
dTT	dithiotreitol
dUMP	acide uridylique
EDTA	disodium éthylène diamine tétraacétate
FBP	protéines liant les folates
5F-dUMP	désoxyfluorouridine monophosphate
FPGS	folylpolyglutamate synthétase
5-FU	5-fluorouracil
F-UTP	fluorouracil triphosphate
F-dUTP	désoxyfluorouridine triphosphate

fmole	fentomole
g	gramme
xg	unité de gravité
GCS	système de clivage de la glycine
h	heure
H <sub>2</sub> -PteGlu	acide dihydroptéroylglutamique
H <sub>2</sub> O	eau
H <sub>4</sub> -PteGlu	acide tétrahydroptéroylglutamique
IC-50	concentration inhibitrice à 50%
K	lysine
KCl	chlorure de potassium
Kd	kilodalton
kg	kilogramme
L	leucine
M	méthionine
mg	milligramme
Mg <sup>++</sup>	ion magnésium
MgCl <sub>2</sub>	chlorure de magnésium
μ	micro
μCi	microCurie
μl	microlitre
ml	millilitre
M	molaire
MES	2-(N-morpholino)-éthane sulfonate
MgOAc	acétate de magnésium
min	minute
M-MLV	réverse transcriptase de <i>murine moloney leukemia virus</i>
MTHFS	méthényltétrahydrofolate synthétase
MTX	méthotrexate
mU	milliunité
N	asparagine
NaCl	chlorure de sodium
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	phosphate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
nm	nanomètre
nM	nanoMolaire
pb	paire de bases

PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérase en chaîne
pmol	picomole
PteGlu	acide ptéroylglutamique
%	pourcentage
pmole	picomole
RT-PCR	transcription inverse suivie par la réaction de chaîne de polymérase
Q	glutamine
S	sérine
SDS	sodium dodécyl sulfate
SHMTc	sérine hydroxyméthyltransférase cytoplasmique
SHMTm	sérine hydroxyméthyltransférase mitochondriale
THF	tétrahydrofolate
TS	thymidylate synthase

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 L'ACIDE FOLIQUE

### 1.1.1 *Sa structure*

Les folates, classés comme vitamines hydrosolubles (B9), sont présents dans les légumes verts, le foie, les céréales et les levures. Ils sont synthétisés par les plantes et certaines bactéries mais non chez les mammifères qui doivent en consommer une quantité minimale ( $3\mu\text{g}/\text{kg}$ ) dans leur alimentation (Herbert, 1987). Un déficit nutritif en acide folique peut causer une anémie mégaloblastique. La désignation chimique de l'acide folique est l'acide ptéroylglutamique (PteGlu). Il est constitué d'un noyau ptéridine relié par un pont méthylène à un acide para-aminobenzoïque pour former l'acide ptéroïque auquel se fixe un résidu d'acide glutamique (Figure 1, page 5). Physiologiquement, l'acide folique est réduit en position 5 et 6 (acide dihydrofolique,  $\text{H}_2\text{-PteGlu}$  ou DHF) puis 7 et 8 pour donner l'acide tétrahydrofolique ( $\text{H}_4\text{-PteGlu}$  ou THF). Des radicaux mono-carbonés, à différents états d'oxydation (Tableau I, page 3), sont ajoutés en position  $\text{N}^5$ ,  $\text{N}^{10}$  ou entre  $\text{N}^5$  et  $\text{N}^{10}$  de l'acide ptéroïque pour donner les différents dérivés du tétrahydrofolate (Figure 2, page 5). Il existe six dérivés du tétrahydrofolate dont trois sont



impliqués dans des cycles métaboliques connus: le 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH<sub>3</sub>-THF) dans la synthèse de la méthionine, le méthylènetétrahydrofolate (CH<sub>2</sub>-THF) dans la synthèse de l'acide thymidylique et le 10-formyltétrahydrofolate (10-CHO-THF) dans la synthèse des purines (Figure 3, page 10). Dans les cellules, ces dérivés possèdent généralement 2 à 6 résidus d'acide glutamique additionnels ajoutés enzymatiquement, par la foylpolylglutamase synthétase, au résidu d'acide glutamique terminal de l'acide folique (Schirch et Strong, 1989).

**Tableau I:** État d'oxydation des unités monocarbonées des cofacteurs foliques.

État d'oxydation		Unité monocarbonée
Le plus réduit	- CH <sub>3</sub>	méthyle
Intermédiaire	- CH <sub>2</sub>	méthylène
Les plus oxydés	- CHO,	formyle,
	- CHNH,	formimino,
	- CH=	méthényle

À des concentrations physiologiques, la majorité des folates tissulaires sont liés à des protéines désignées FBP pour "folate binding proteins" (Zamierowski et al., 1974). À des

concentrations pharmacologiques, le 5 et le 10-formyltétrahydrofolate sont les deux formes de folates retrouvées libres dans le cytoplasme alors que le tétrahydrofolate, le méthylène-tétrahydrofolate et le 5-méthyltétrahydrofolate sont les formes majeures liées aux FBPs (Matherly et al., 1990).

Chez les eucaryotes, la majorité des enzymes du cycle des folates possèdent des isoformes cytoplasmiques et mitochondriales. Cette compartimentalisation intracellulaire est aussi observée pour les dérivés du tétrahydrofolate. Des rôles fonctionnels sont attribués à chaque compartiment en fonction des enzymes des folates et de leurs substrats. Des études sur des mutants privés d'enzymes mitochondriaux ou cytoplasmiques ont permis de mieux comprendre leur fonction. Dans le cytoplasme, les cofacteurs foliques sont responsables de la synthèse *de novo* des purines et de l'acide thymidilique. La synthèse de la sérine à partir de la glycine (Figure 3A, page 10) se ferait également à ce niveau. Dans les mitochondries, la conversion de la sérine en glycine prédomine. La formation d'acide ribonucléotidique de transfert (ARNt) formylé, indispensable à l'initiation de la synthèse protéique, est assurée par les cofacteurs foliques intramitochondriaux (Lucchini et Bianchetti, 1980).

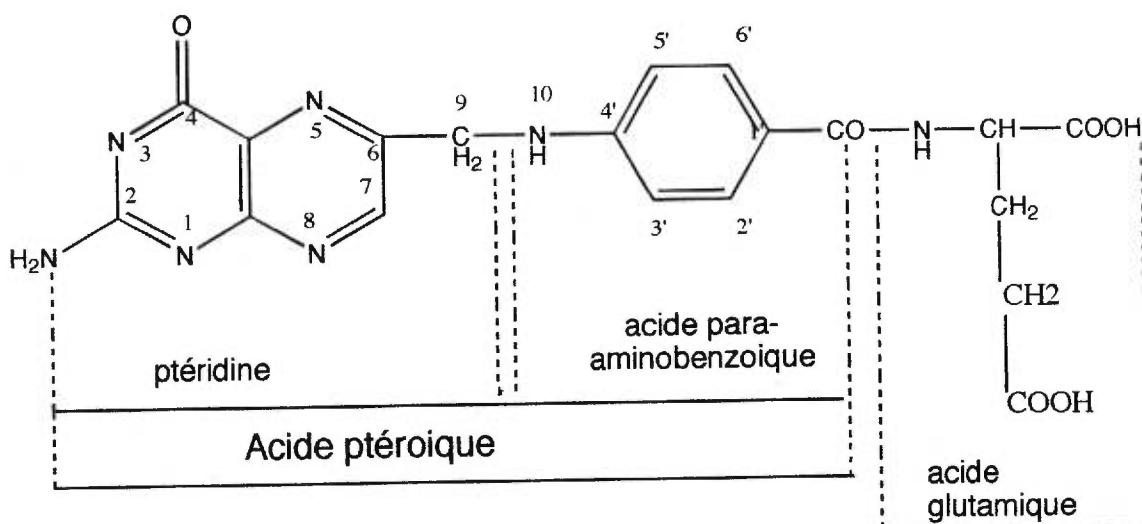
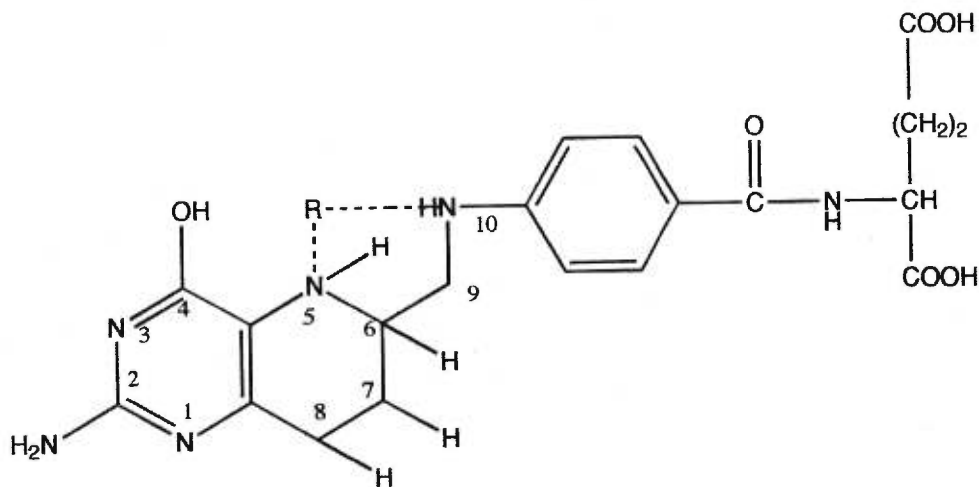


Figure 1 : acide ptéroylglutamique (acide folique)



R =

- CHO
- CHO
- CH=NH
- CH
- CH<sub>2</sub>
- CH<sub>3</sub>

- N<sup>5</sup> formyl THF
- N<sup>10</sup> formyl THF
- N<sup>5</sup> formimino THF
- N<sup>5-10</sup> méthényl THF
- N<sup>5-10</sup> méthylène THF
- N<sup>5</sup> méthyl THF

Figure 2: Résidus monocarbonés portés en N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup> ou entre N<sup>5</sup> et N<sup>10</sup> de l'acide tétrahydrofolique (THF)

## 1.1.2 *Interconversion des folates intracellulaires*

### 1.1.2.1 *Le cycle de la sérine et de la glycine*

La sérine constitue la source majeure des unités monocarbonées transportées par les dérivés tétrahydrofolates (Schirch, 1984). La sérine hydroxyméthyltransférase cytoplasmique (SHMTc) catalyse le transfert du groupe monocarboné  $\text{CH}_2$  de la sérine au tétrahydrofolate pour donner la glycine et le 5,10-méthylènetétrahydrofolate (5,10- $\text{CH}_2$ -THF) (Schirch, 1982) (Figure 3A, page 10). Le 5,10- $\text{CH}_2$ -THF est métabolisé par le complexe enzymatique  $\text{C}_1$ -THF synthase regroupant les trois enzymes suivantes: la 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase, la 5,10-méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase et la 5,10-méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase. Cette conversion donne deux autres cofacteurs, le 5,10-méthényltétrahydrofolate (5,10- $\text{CH}^+$ -THF) et le 10-formyl-tétrahydrofolate (10-CHO-THF) (Figure 3B, 3C, page 10). La SHMT mitochondriale (SHMTm) produit de la sérine qui est ensuite métabolisée en formate avant de retourner dans le cytoplasme. Le formate y fournit alors un groupe monocarboné au tétrahydrofolate par l'intermédiaire de la 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase (Figure 3D, page 10) (Pasternack et al, 1994). Dans les mitochondries, l'acide formique peut être généré à

partir de la glycine dans les cellules renfermant le complexe enzymatique GCS (Glycine cleavage system) (Figure. 3E, page 10). Ce complexe est formé de quatre protéines ancrées dans la membrane mitochondriale interne (Schirch, 1984). Chez les mammifères, le complexe a été identifié au niveau du foie, des reins et du cerveau. Les fonctions du GCS consistent à synthétiser du  $\text{CH}_2$ -THF et de la sérine à partir de la glycine et ainsi assurer une source de groupes formyles (Figure 3, page 10). Ces unités monocarbonées sont essentiels à la production de l'ARNt-formylméthionyl requise pour la synthèse protéique cytoplasmique. Chez des malades atteints d'hyperglycinémie noncétonique, le GCS est défectueux, menant à une accumulation de glycine qui est associée à des désordres neurologiques.

#### ***1.1.2.2 Le rôle régulateur du 5-méthyltétrahydrofolate et de la méthionine***

La méthionine est un métabolite clé contrôlant le métabolisme des unités monocarbonées (Krebs et al., 1976; Jägerstad et al., 1980; Eells et al., 1982; Shane et Stokstad, 1983). Quand les concentrations de méthionine augmentent, la synthèse du 5- $\text{CH}_3$ -THF diminue et sa déméthylation augmente. La diminution de la synthèse du 5- $\text{CH}_3$ -THF favorise l'accumulation de son précurseur, le  $\text{CH}_2$ -THF (Figure 3A, 3F, page 10). Le  $\text{CH}_2$ -THF

est utilisé pour la synthèse de l'acide thymidylique et de la sérine (Figure 3A, page 10). Quand les concentrations de méthionine baissent, les niveaux de 5-CH<sub>3</sub>-THF augmentent et sa déméthylation diminue avec une baisse conséquente du CH<sub>2</sub>-THF (Figure 3F, page 10). Si les niveaux de méthionine sont très faibles et si la reméthylation de l'homocystéine à partir du 5-CH<sub>3</sub>-THF n'est pas maintenue, le 5-CH<sub>3</sub>-THF s'accumulera et une déficience des différents cofacteurs des folates suivra (Kisliuk, 1984).

### 1.1.2.3 *Biosynthèse de l'acide thymidylique*

La sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), la thymidylate synthase (TS) et la dihydrofolate réductase (DHFR) sont les enzymes qui catalysent le cycle de l'acide thymidylique. Ces enzymes fournissent, à partir du CH<sub>2</sub>-THF, le groupe monocarboné CH<sub>2</sub> à l'acide uridylique (dUMP) pour former l'acide thymidylique (dTMP). Cette réaction est une réaction de réduction couplée à une oxydation du tétrahydrofolate en dihydrofolate (Figure 4, page 11) (Friedkin et al., 1973). L'anabolisme du dTMP est au centre du mécanisme de l'action cytotoxique de certains médicaments anti-néoplasiques tels le méthotrexate (MTX) et le 5-fluorouracil (5-FU) (Hitchings et al., 1980; Heidelberger et al., 1983; Hitchings et al., 1983). La cytotoxicité du MTX réside dans sa capacité d'inhiber la DHFR. Cette inhibition empêche la formation du

tétrahydrofolate à partir du dihydrofolate et conséquemment toutes les synthèses reliées au transfert des groupes monocarbonés sur le tétrahydrofolate. Le mode d'action du 5-FU nécessite sa conversion en désoxyfluorouridine (5-FdUMP). Ce métabolite bloque réversiblement la synthèse de la thymidylate, un élément essentiel à la synthèse de l'ADN.

#### 1.1.2.4 *Biosynthèse des purines*

Le 10-formyltétrahydrofolate (10-CHO-THF) est impliqué dans la synthèse des purines (Figure 3G, page 10). Deux enzymes, la phosphoribosylglycinamide formyltransférase et la phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransférase (AICAR) catalysent le transfert du radical monocarboné provenant du 10-CHO-THF, en position 2 et 8 de l'acide inosinique (Figure 5, page 12) (Buchanan, 1982).

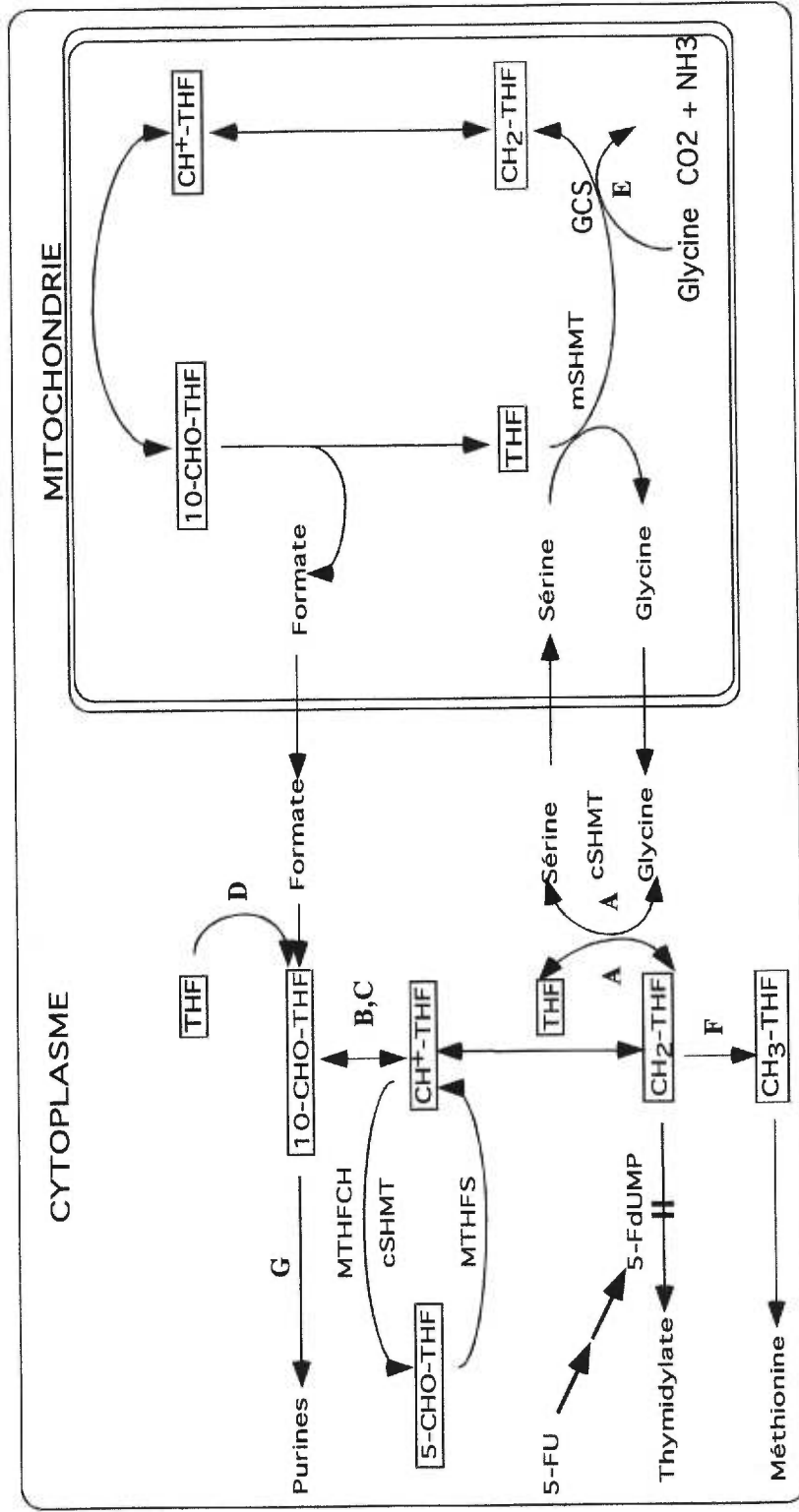
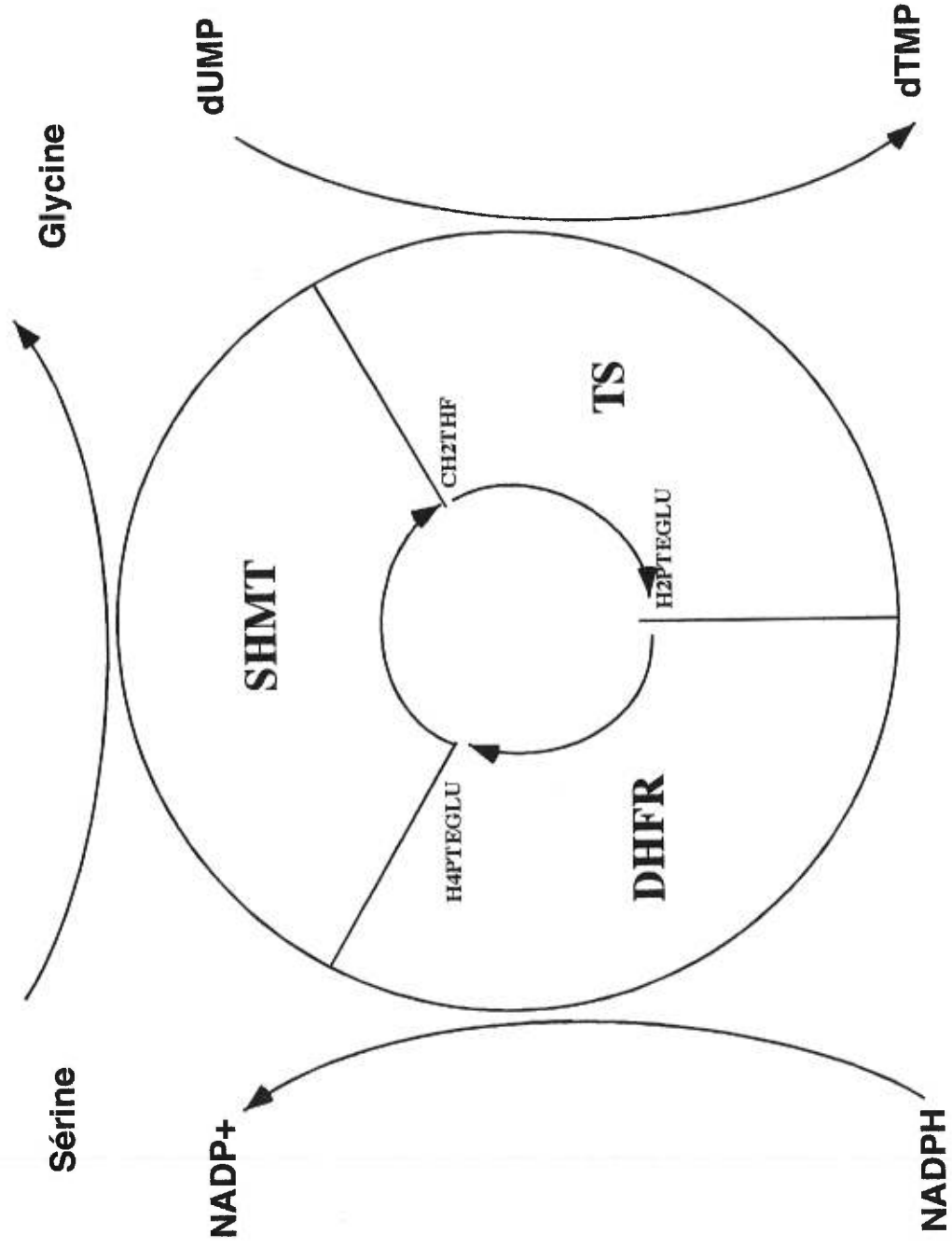


Figure 3:

Voies métaboliques associées au métabolisme des unités monocarbonées

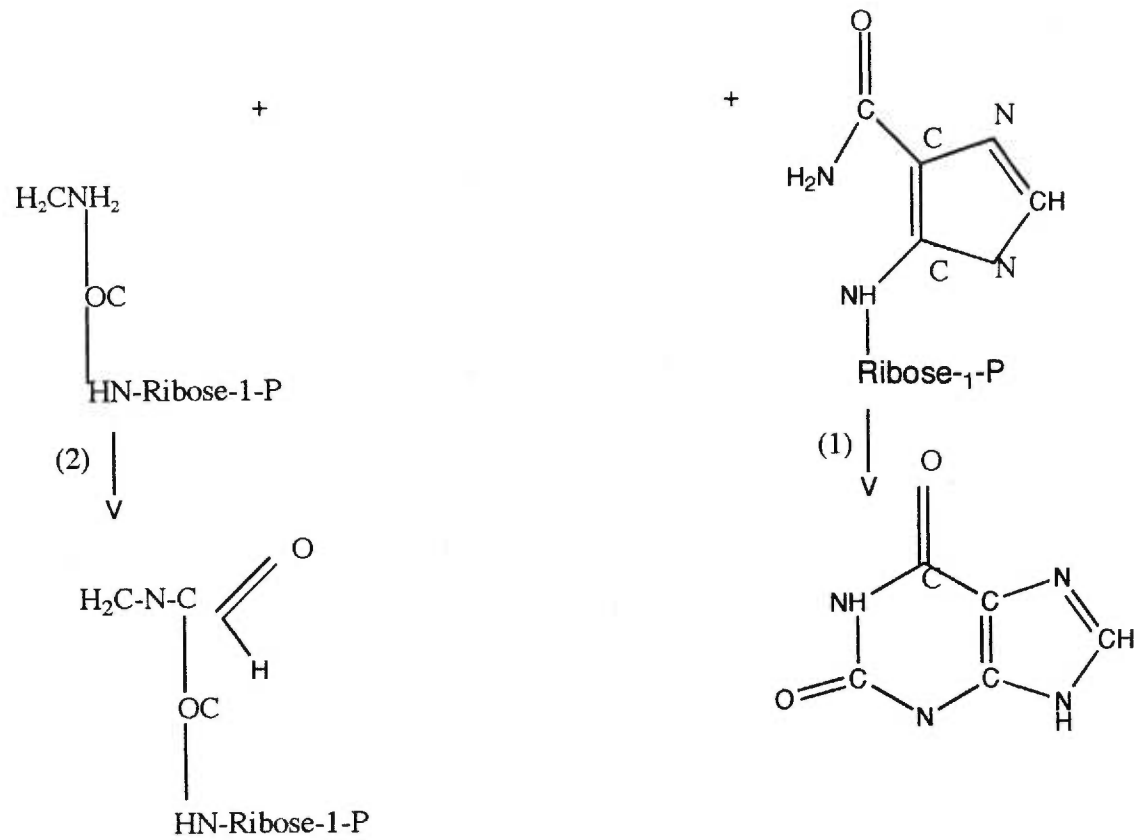
A: sérine hydroxyméthyltransférase, B et C: C<sub>1</sub>-THF synthase, D: 10-formyltétrahydrofolate synthétase, E: système de clivage de la glycine, F: méthyltétrahydrofolate synthétase, G: phosphoribosylglycinamide formyltransférase et phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransférase.





**Figure 4:**  
Le cycle de formation de l'acide thymidilique dTMP

## 10-CHO-THF



Formylglycinamide ribonucléotide

Acide inosinique

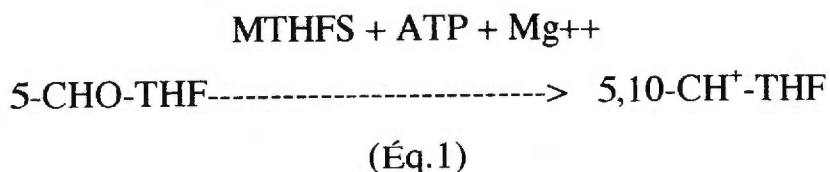
**Figure 5:**

**Les réactions catalysées par la phosphoribosylglycinamide formyltransférase (1) et la phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransférase (2).**

## 1.2 LA MÉTHÉNYLTÉTRAHYDROFOLATE SYNTHÉ- TASE HUMAINE

### 1.2.1 Biochimie de la MTHFS

La méthényltétrahydrofolate synthétase (MTHFS) catalyse la transformation unidirectionnelle du 5-formyltétrahydrofolate (5-CHO-THF) en méthényltétrahydrofolate (CH<sup>+</sup>-THF) en présence d'ATP et d'ions magnésium Mg<sup>++</sup> (Équation 1):



Le produit est ensuite converti en d'autres dérivés des tétrahydrofolates. La MTHFS a été purifiée à partir de *Lactobacillus casei* (Grimshaw et al., 1984), de foie de mouton (Greenberg et al., 1965), de lapin (Hopkins et al., 1984) et de foie humain (Bertrand et al., 1987). La MTHFS humaine a été retrouvée dans des mitochondries isolées de foie normal et de cellules de lymphome de Burkitt (CA-46). L'activité enzymatique spécifique de la MTHFS mitochondriale est identique à celle de la MTHFS cytoplasmique et représente 15% de l'activité totale de l'enzyme dans la cellule (Bertrand et al. 1995).

### 1.2.2 Rôle physiologique du 5-CHO-THF

Le 5-CHO-THF a été retrouvé dans toutes les cellules où il a été recherché. Bien qu'aucune réaction physiologique ne lui permette d'échanger son groupe monocarboné, il est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques. Ses dérivés polyglutamylés peuvent inhiber plusieurs enzymes du cycle des folates. Drs. Verne Schirch (Collège Médical de Virginie) et Edwin Cossins (Université d'Alberta) ont démontré que, chez les spores de *Neurospora* à l'état de dormance, le métabolisme des folates est ralenti et presque tous les folates se trouvent sous la forme du 5-CHO-THF polyglutamylé. Par contre, quand l'organisme se transforme en *mycelia*, le 5-CHO-THF est métabolisé en d'autres dérivés réduits du tétrahydrofolate (THF), ce qui résulte en une augmentation du métabolisme des folates (Kruschwitz et al., 1994). Ces observations suggèrent l'importance du 5-CHO-THF polyglutamylé dans la régulation de la synthèse des unités monocarbonées. Ceci a été démontré par le groupe du Dr. Jacques Jolivet dans des cellules de cancer du sein MCF-7. En inhibant les sites actifs de la MTHFS par un analogue de son substrat, le 5-formyltétrahydrohomofolate, les concentrations intracellulaires du 5-CHO-THF doublent. On observe parallèlement une réduction dans les mêmes proportions des niveaux du CH<sub>3</sub>-THF et un abaissement de la croissance cellulaire

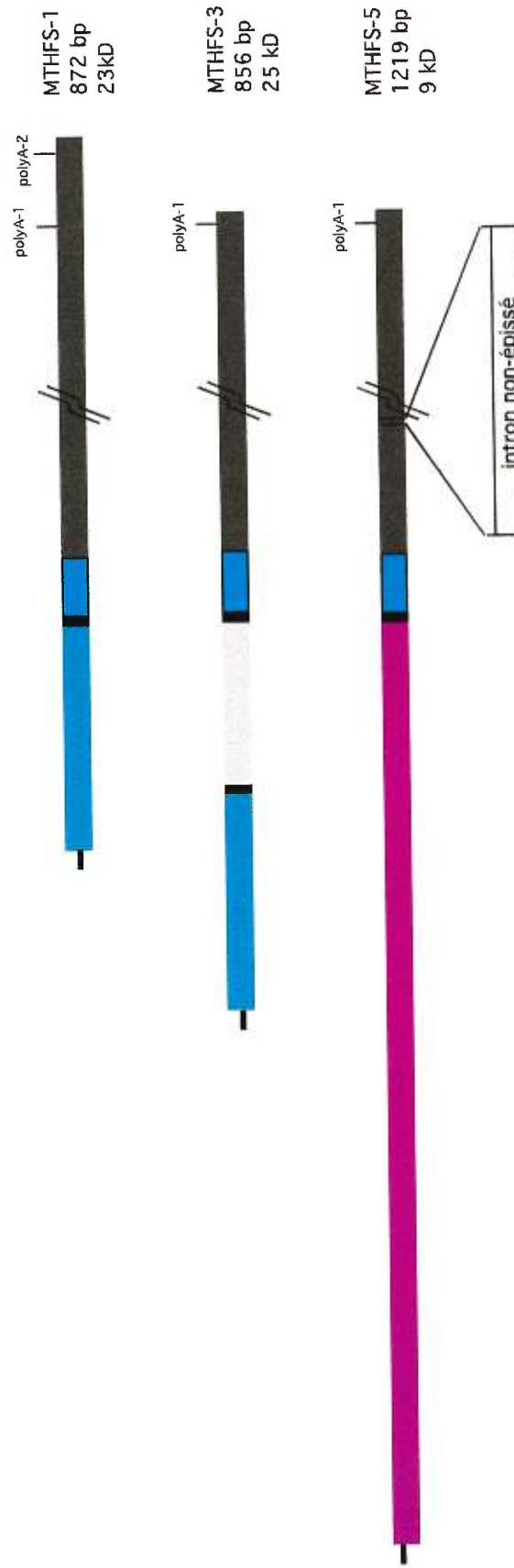
corrélé avec une diminution de la synthèse *de novo* des purines. Ces effets s'expliquent par l'inhibition de l'enzyme AICAR formyltransférase par les dérivés polyglutamylés du 5-CHO-THF (Bertrand et Jolivet, 1989b). Récemment, le rôle physiologique du 5-CHO-THF polyglutamylé endogène a été étudié par le groupe du Dr. Patrick Stover. Des cellules de neuroblastome humain (5Y) ont été transformées avec l'ADN complémentaire de la MTHFS cytoplasmique et des transformés stables surexprimant cet enzyme ont été isolés (Girgis et al., 1997). Des études de cinétique enzymatique avaient antérieurement démontré que le 5-CHO-THF était synthétisé dans la cellule par une activité intracellulaire secondaire de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) qui le forme à partir du méthényltétrahydrofolate ( $\text{CH}^+$ -THF) (Stover et Schirch, 1990). Une fois synthétisé le 5-CHO-THF reste lié au site actif de la SHMT dont il inhibe la fonction (Stover et Schirch, 1990). La déplétion des concentrations intracellulaires du 5-CHO-THF par surexpression de la MTHFS permet la libération des sites catalytiques de la SHMTc et on observe une augmentation de son activité enzymatique. Un apport exogène en glycine favorise la production de la sérine et du tétrahydrofolate (Figure 3A, page 10). Ceci a pour conséquence de dépléter les niveaux du 5-CH<sub>3</sub>-THF, empêchant ainsi, la reméthylation de l'homocystéine en méthionine et diminuant la croissance cellulaire de 30 à 40%. Ces résultats démontrent que les niveaux intracellulaires du

5-CHO-THF contrôlent l'activité de la SHMT cytoplasmique et le métabolisme des unités monocarbonées dans ces cellules de neuroblastome.

### 1.2.3 *Biologie moléculaire de la MTHFS*

L'ADN complémentaire (MTHFS-1) codant pour la MTHFS humaine a été isolé et séquencé (Dayan et al., 1994). L'ARN messager a une séquence de 872 pb et code pour une protéine de 23,229 daltons. Deux autres ADN complémentaires de 878 pb et de 1219 pb ont été identifiés et désignés MTHFS-3 et MTHFS-5. Les trois isoformes d'ADN complémentaires possèdent une région commune de 714 pb, située à l'extrémité 3'. Les analyses de séquences des ADN complémentaires révèlent que l'isoforme 3 est identique à l'isoforme 1 à l'exception d'une séquence centrale de 75 pb insérée devant la région commune aux trois isoformes. L'isoforme MTHFS-3 code pour une protéine ayant un poids moléculaire de 25,854 daltons. L'ADN complémentaire de l'isoforme MTHFS-5 a une région, à l'extrémité 5', différente et possède une séquence additionnelle de 146 pb insérée dans la région commune. Cette séquence contient de multiples codons stops. La MTHFS-5 code donc pour une protéine tronquée de 80 acides aminés ayant un poids moléculaire de 9,230 daltons (Figure 6, page 18). Une analyse de type "Southern" sur de l'ADN génomique

humain, hybridé avec différentes sondes spécifiques à chacun des isoformes, suggère la présence d'un gène unique. Ceci est renforcé par une hybridation *in situ* où le gène est localisé uniquement au niveau du chromosome 15q23-25 (J. Jolivet, communication personnelle). Des études sont en cours pour isoler des clones génomiques et étudier l'organisation du gène et du promoteur de la MTHFS.



**Figure 6:**

**Les ADN complémentaires de la MTHFS**  
**Représentation graphique des différents ADN complémentaires de la MTHFS.**  
**Les différentes couleurs correspondent aux différentes séquences nucléotidiques.**



## 1.3 LE 5-FLUOROURACIL

### 1.3.1 *Sa cible et son mécanisme*

Le 5-fluorouracil (5-FU), une pyrimidine fluorée est un antimétabolite dont la structure ressemble à celle de l'uracile, un des constitutants nécessaires à la synthèse nucléique et la division cellulaire. Son utilité repose sur la préférence qu'ont les cellules néoplasiques pour la molécule d'uracile lors de la biosynthèse des acides nucléiques. Le 5-fluorouracil est transformé en monophosphate de 2-désoxyfluorouridine (5F-dUMP). Le 5F-dUMP est la forme cytotoxique intracellulaire qui se lie au niveau du site catalytique de la thymidylate synthase (TS), enzyme clé de la synthèse d'ADN. De ce fait, la réaction catalytique normale de transformation du dUMP en dTMP ne peut se produire. La présence d'un cofacteur, le méthylènetétrahydrofolate ( $\text{CH}_2$ -THF) est nécessaire à l'établissement d'un lien stable entre le 5F-dUMP et la TS, d'où la formation d'un complexe ternaire entre le 5-FdUMP, la TS et le  $\text{CH}_2$ -THF (Santi et McHenry, Langenbach et al., 1972). L'augmentation des niveaux intracellulaires de méthylènetétrahydrofolate stabilise le complexe ternaire, ce qui a pour effet d'augmenter la cytotoxicité du 5-FU. Des expériences réalisées en culture cellulaire (Ullman et al., 1978; Evans et al., 1981) ou sur des xénogreffes d'adénocarcinomes coliques humains

chez la souris (Houghton et al., 1981) ont démontré que les effets antitumoraux du 5-FU peuvent être potentialisés par un apport exogène de folates monoglutamylés tel le 5-formyltétrahydrofolate (connu commercialement sous le nom de Leucovorin<sup>MD</sup>). Des études cliniques ont démontré une augmentation du taux de réponse à un traitement combinant le 5-FU et le leucovorin<sup>MD</sup> par rapport au 5-FU seul sans augmentation de survie cependant (Étienne et al., 1996).

### ***1.3.2 Les paramètres affectant l'efficacité clinique du 5-fluorouracil***

#### ***1.3.2.1 Métabolisme des folates***

Des études de Mullin et al. (1988) ont démontré que le métabolisme des folates est différent entre un tissu normal et un tissu cancéreux. Des observations faites sur l'adénocarcinome colique murin 38 démontrent que le 5-CHO-THF est très peu transformé en d'autres folates réduits tel le CH<sub>2</sub>-THF. Par contre la métabolisation du 5-CHO-THF en CH<sub>2</sub>-THF est importante au niveau du tissu hépatique normal murin. Cette incapacité de transformer le 5-CHO-THF origine d'une diminution de l'activité de la MTHFS dans le tissu cancéreux par rapport au foie normal (Mullin et al., 1988). Ce modèle expérimental propose que la

différence d'activité de la MTHFS entre les tissus modulerait la métabolisation intracellulaire du 5-CHO-THF en CH<sub>2</sub>-THF et serait donc importante pour la potentialisation du 5-FU par le 5-CHO-THF.

D'autres études menées sur des échantillons de tumeurs de patients traités, ont porté sur les mécanismes de résistance au 5-FU. Elles indiquent que le degré de polyglutamylation des dérivés des folates ainsi que le niveau d'expression de la TS peuvent affecter la réponse au traitement chimiothérapeutique utilisant le 5-FU.

#### **1.3.2.2 La polyglutamylation**

Le rôle de la folylpolyglutamate synthétase (FPGS) dans la réponse des cellules tumorales au traitement à base de 5-FU a été abordé dans des études *in vitro*. Le groupe du Dr. Bertino (Wang et al., 1993) l'a étudié dans les cellules d'adénocarcinome colique HCT-8 exposées durant quatre heures au 5-FU. Ils ont démontré que la liaison du F-dUMP à la TS ne différait pas entre la lignée parentale HCT-8 et la lignée résistante HCT-8/4hR. De plus, aucune différence d'activité TS n'a pu être observée. Cependant, l'activité de la FPGS ainsi que son niveau d'expression en ARNm étaient beaucoup plus faibles dans les cellules résistantes au 5-FU par rapport aux cellules parentales. Le rôle de la polyglutamylation est d'augmenter l'affinité des dérivés du tétrahydrofolate pour les enzymes du cycle des folates (Shane,

1989). Elle joue aussi un rôle dans l'accumulation des dérivés du tétrahydrofolate en les empêchant de traverser les membranes cytoplasmiques et mitochondriales (Lowe et al., 1993). Ainsi, les folates transportés sont métabolisés en des dérivés polyglutamylés dont le nombre de monomères varie suivant les niveaux d'activité de la FPGS. À de faibles concentrations des dérivés du tétrahydrofolate, leur accumulation est indépendante de l'activité de la FPGS. À des concentrations pharmacologiques, leur accumulation est proportionnelle à l'activité de la FPGS et la longueur de leurs chaînes d'acide glutamique diminue. À des concentrations encore plus élevées, la compétition entre les substrats pour la FPGS limite le degré de polyglutamylation et moins de 5% des folates transportés sont retenus. Pour les dérivés du THF impliqués dans des cycles métaboliques, un nombre minimal de monomères d'acide glutamique est requis. Ainsi, l'addition de 3 acides glutamiques est indispensable pour le  $\text{CH}_2$ -THF impliqué dans la synthèse de l'acide thymidilique. Cliniquement, une diminution de la polyglutamylation du  $\text{CH}_2$ -THF interfère avec la stabilité de la liaison du 5F-dUMP à la TS et l'efficacité du 5-FU (Cheradame et al., 1997).

### 1.3.2.3 *La thymidylate synthase*

Le niveau d'expression de la thymidylate synthase (TS) joue un rôle important dans l'activité des traitements à base de 5-FU.

Plusieurs groupes se sont intéressés à quantifier à des fins diagnostiques, les niveaux de la TS libre ou prise dans le complexe ternaire dans des tissus cancéreux. Traditionnellement, la quantification et la détection du complexe ternaire  $\text{CH}_2\text{-THF-TS-FdUMP}$  dans des tissus humains ont été obtenues par des essais enzymatiques. Ces essais mesuraient soit l'activité catalytique résiduelle de la TS ou le 5F-dUMP radioactif lié à la TS. Ces essais sont utilisables lorsque les concentrations cellulaires en TS sont élevées, que l'enzyme est active ou que les tissus sont frais. De plus, ils ne distinguent pas entre les régions morphologiques différentes de la tumeur. L'avènement de la technologie des anticorps monoclonaux a permis de détecter, de localiser et de quantifier la TS au niveau des tissus humains (Drake et al., 1993; Johnston et al., 1991). Il semble que les cellules les plus sensibles au 5-FU sont celles qui expriment le plus faible niveau de TS (Étienne et al., 1996). D'autres ont démontré que certaines cellules tumorales surproduisent la TS comme un mécanisme de protection contre le stress cytotoxique. L'augmentation des concentrations cellulaires de la TS est due, dans certains cas, à une amplification de son gène (Johnston et al., 1995; Chu et al., 1996). Chez des patients atteints du cancer du côlon, une augmentation des niveaux de la protéine TS est généralement associée à une résistance clinique aux effets du 5-FU (Leichman et al., 1995; Lenz et al., 1996; Johnston et al., 1997).

#### 1.4 INTÉRÊTS PHARMACOLOGIQUES DE LA MTHFS

Le cycle des folates est une cible importante pour plusieurs agents anticancéreux vu son rôle central pour la synthèse de l'acide thymidilique et de bases puriques. Un des composés employé en chimiothérapie est le 5-fluorouracil (5-FU). Le 5-FU est métabolisé en 5-fluorodéoxyuridine monophosphate (5F-dUMP) qui forme un complexe ternaire stable avec la TS et son cofacteur le méthylènetétrahydrofolate ( $\text{CH}_2$ -THF), inactivant ainsi l'enzyme. Certaines tumeurs apparaissent cependant résistantes à la chimiothérapie au 5-FU. Les paramètres prédictifs de l'efficacité thérapeutique au 5-FU sont les taux de 5F-dUMP, dUMP,  $\text{CH}_2$ -THF et de thymidylate synthase (Johnston et al., 1994). Probablement seuls les niveaux bas de  $\text{CH}_2$ -THF associés à une mauvaise réponse clinique pourraient être corrigés cliniquement. Le  $\text{CH}_2$ -THF est produit par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) qui catalyse le transfert d'un groupe monocarboné de la sérine au tétrahydrofolate. L'activité de la SHMT est contrôlée, à son tour, par les concentrations intracellulaires du 5-CHO-THF. La méthényltétrahydrofolate synthétase (MTHFS) contrôle les niveaux endogènes du 5-CHO-THF en le convertissant de façon irréversible en  $\text{CH}^+$ -THF. La MTHFS lèverait l'inhibition des sites actifs de la SHMT causée par le 5-CHO-THF et favoriserait la production du

CH<sub>2</sub>-THF et l'efficacité clinique du 5-FU. L'analyse des niveaux endogènes de la MTHFS de ces tumeurs serait particulièrement intéressante pour tenter d'expliquer les résistances au 5-FU.

## 1.5 PROJET DE RECHERCHE

La MTHFS représente l'étape métabolique initiale dans la conversion du 5-CHO-THF en CH<sub>2</sub>-THF. Dans un modèle de tumeur chez le rat, une baisse d'activité de la MTHFS est associée à une diminution intracellulaire du taux d'interconversion des folates (dont le CH<sub>2</sub>-THF) et une absence de réponse aux traitements chimiothérapeutiques à base du 5-FU. La potentialisation de la cytotoxicité du 5-FU réside dans l'inhibition complète des sites actifs de la TS par un complexe ternaire stable. Nous avons vu que les concentrations intracellulaires de la TS peuvent varier par amplification génique et sont donc difficilement contrôlables. À l'opposé, une augmentation des concentrations du CH<sub>2</sub>-THF pourrait favoriser la formation et la stabilité du complexe dans des conditions saturantes de 5F-dUMP. L'augmentation des niveaux endogènes du CH<sub>2</sub>-THF semble possible en favorisant la voie de synthèse catalysée par la SHMT non-inhibée par le 5-CHO-THF. Les niveaux d'expression de la MTHFS pourraient influencer la réponse aux traitements à base de 5-FU par conversion du 5-CHO-THF, ce qui aurait pour effet de favoriser la synthèse du CH<sub>2</sub>-THF. D'où l'importance d'étudier son expression. Le présent projet a donc pour objectifs de :

- 1) quantifier la MTHFS (protéines et ARNm) dans des tissus humains normaux ainsi que plusieurs lignées cellulaires



cancéreuses.

2) établir la relation entre l'effet de la surexpression de la MTHFS et la biosynthèse du  $\text{CH}_2$ -THF dans le cadre de la cytotoxicité au 5-FU.

# **CHAPITRE 2**

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Quantification des ARNm de la MTHFS

#### 2.1.1 *Extraction des ARNs totaux des tissus*

Les ARNs totaux ont été isolés de tissus provenant de biopsies conservés dans l'azote liquide immédiatement suivant la chirurgie. L'extraction a été réalisée par la méthode de Chirgwin et al. (1979). Des fragments de tissus ont été homogénéisés à raison de 2 g de tissus/20 ml d'une solution E (5 M d'isothiocyanate de guanidium, 0.1 M de Tris-HCl pH 7.5 et 0.02 M de Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0). L'homogénat a ensuite été centrifugé à 12,000xg durant 10 minutes à 12°C. Le surnageant a été récupéré et complété à 2% avec du Sarkosyl avant d'être chauffé à 65°C durant 2 minutes. Les surnageants ont été additionnés de 0.1 g/ml de chlorure de césium et le tout a été déposé sur un coussin (9 ml) de chlorure de césium (5.7 M). Les coussins ont ensuite été centrifugés à 113,000xg durant 18 heures à 22°C. Les surnageants ont été retirés en prenant soin d'éviter toute contamination avec les culots. Ces derniers ont été resuspendus dans 3 ml d'une solution F (5mM EDTA, 0.5% N-lauroylsarcosine et 5% de β-mercaptoéthanol). La solution d'ARN ainsi obtenue a été extraite 2 fois avec une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) pour en retirer

les contaminants protéiques résiduels avant d'être précipité à l'éthanol. Les culots D'ARNs ainsi obtenus ont été resuspendus dans un volume approprié d'eau traitée au diéthyl pyrocarbonate (DEPC, Aldrich Chemical Company, Inc.) et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

### ***2.1.2 Extraction des ARNs totaux des cellules***

Des lignées cellulaires de cancer du côlon, du sein, du poumon et de neuroblastome ont été cultivées à 80% de confluence avant l'extraction de leurs ARNs totaux. Les tapis cellulaires ont été lysés en ajoutant 1ml de Trizol (Gibco-BRL) par pétri de 3.5 cm de diamètre. Le Trizol est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidium. Les lysats cellulaires obtenus ont été incubés à  $25^{\circ}\text{C}$  durant 5 minutes avant d'y ajouter 2% de chloroforme. Les mélanges ont été vortexés, incubés à  $25^{\circ}\text{C}$  durant 3 minutes et centrifugés à  $12,000\times g$  durant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . La phase aqueuse a été prélevée et conservée. Les ARNs contenus dans cette phase ont été précipités en ajoutant 50% du volume de la phase d'isopropanol. Après une incubation de 10 minutes à  $25^{\circ}\text{C}$ , les mélanges ont été centrifugés à  $12,000\times g$  durant 30 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les culots d'ARNs ont été resuspendus dans un volume approprié d'eau traitée au DEPC (Aldrich Chemical Company, Inc.) et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

### **2.1.3 Synthèse du brin d'ADN complémentaire**

Le premier brin d'ADN complémentaire a été synthétisé à partir d'ARNs totaux complexés à une amorce d'homopolymère de désoxythymidine (oligo dT). Une solution riche en ARN total (60  $\mu\text{g}$ ) a été complexée à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de l'amorce oligo (dT)<sub>12-18</sub> dans un volume de 8.7  $\mu\text{l}$ . Cette solution a été incubée à 65°C durant 10 minutes avant l'ajout de 4  $\mu\text{l}$  du tampon 5X (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM de KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT) , 0.5 mM de chaque dNTP, 15 unités de RNasin (Gibco-BRL) et 200 unités de M-MLV transcriptase inverse (Gibco-BRL). Le mélange a été incubé à 37°C durant 60 minutes. La réaction a été arrêtée par chauffage à 95°C durant 5 minutes.

### **2.1.4 Réactions de PCR**

La MTHFS possède au moins trois isoformes : MTHFS-1, 3 et 5. Pour amplifier ces isoformes, nous avons utilisé une amorce anti-sens située dans une région homologe aux trois isoformes. La spécificité de l'amplification repose sur l'amorce 5' qui a été choisie de façon à générer des bandes de poids moléculaire différent pour chaque isoforme. De cette façon, les trois isoformes visés ont été amplifiés simultanément et séparés sur un même gel d'agarose. L'amorce en 5' spécifique pour les isoformes 1 et 3

possède la séquence suivante: 5'-AGCGGTGGCAGCGCCAA-3' et celle pour MTHFS-5: 5'-TTGTCTCCACAGTGAC-3'. L'amorce spécifique aux trois isoformes utilisée comme brin antisens possède la séquence suivante: 5'-CTTCTCTAGTAGTTCCTGT-3'. Les fragments auront la longueur: MTHFS-1 (200 pb), MTHFS-3 (280 pb) et MTHFS-5 (370 pb). Dans chaque réaction de PCR semi-quantitative, 5  $\mu$ l du tampon de PCR 10X (500 mM de KCl, 200 mM de Tris-HCl (pH 8.3)), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ M des amorces, 200  $\mu$ M de dNTPs, 10 unités de l'enzyme TaqI ADN polymérase (Gibco-BRL) et 0.2  $\mu$ Ci de l' $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP ont été ajoutés à 0.6  $\mu$ g d'ADN complémentaire synthétisé comme ci-haut. Le mélange a été recouvert de 50 $\mu$ l d'huile de paraffine. Les tubes ont ensuite été placés dans un cycleur thermique de PCR où ils ont subi 25 cycles d'amplification (94°C, 30 secondes; 55°C, 30 secondes; 72°C, 2 minutes). Les produits de PCR (1/5 du volume) ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 2% dans un tampon de migration TAE 1X (40 mM Tris-acétate, 2mM EDTA). Les fragments d'ADN amplifiés ont été transférés sur une membrane Hybond N<sup>+</sup> (Amersham), en milieu alcalin (400 mM de NaOH) durant 18 heures. Les membranes ont ensuite été neutralisées dans 500 mM de Tris-HCl (pH 7.5) et séchées à l'air ambiant avant d'être exposées durant 10 à 60 minutes contre des films XAR (Kodak).

### 2.1.5 *Buvar dage Southern*

La spécificité des fragments amplifiés a été testée par buvardage "Southern". Les produits de PCR non-radioactifs ont été séparés sur gel d'agarose. Les fragments d'ADN ont été transférés sur des membranes Hybond N<sup>+</sup> en milieu alcalin durant 18 heures. Les ADNs ont été fixés par une irradiation aux ultraviolets (Sambrook et al., 1989). Les membranes ont été préhybridées, durant 4 heures à 42°C, dans du tampon contenant; 50% de formamide, 5X de Denhart (Sambrook et al., 1989), 5X de SSPE (3 M de NaCl, 200 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O et 19.9 mM EDTA), 0.1% de SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Une sonde spécifique à la région commune des 3 isoformes de la MTHFS a été amplifiée par PCR. Cette sonde a été marquée au [<sup>32</sup>P]dCTP suivant la technique d'amorçage aléatoire: 20-70 ng d'ADN/33µl d'H<sub>2</sub>O a été chauffé à 100°C durant 3 minutes, refroidi à 4°C puis 10 µl du mélange réactionnel, 5µl de [<sup>32</sup>P]dCTP et 1 µl de Klenow ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à 37°C durant 2 heures. La sonde a été purifiée des nucléotides non-incorporés par chromatographie sur colonne de Sephadex G-50 et dénaturée par chauffage à 100°C durant 5 minutes. La sonde a été ajoutée directement au tampon de préhybridation (10<sup>6</sup>cpm/ml). L'hybridation s'est poursuivie durant 18 heures à 42°C. Les membranes ont ensuite été lavées dans 100

ml d'un tampon 2X SSC et 0.1% SDS à 25°C durant 45 minutes suivi par un lavage final dans 100ml d'une solution composée de 0.1X SSC et 0.1% SDS à 55°C durant 30 minutes. Les membranes ont été exposées contre des films XAR (Kodak) durant 10 à 60 minutes.

## **2.2 Buvardage Western**

### **2.2.1 *Extraction et dosage des protéines***

Les extraits protéiques ont été obtenus à partir d'échantillons de tissus normaux et/ou néoplasiques broyés, à l'aide d'un homogénéisateur électrique, à raison de 0.5 g/ml dans le tampon G (20 mM de Pipes, 20 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 10 mM d'acétate de magnésium). Les homogénats ont été centrifugés à 10,000xg, durant 10 minutes à 4°C et filtrés sur laine de verre. Les extraits provenant de cellules en culture (80% de confluence) ont été obtenus après la lyse des tapis cellulaires par l'ajout de 1 ml du tampon H (1% de Triton X-100, 50 mM de Tris (pH8.0) et 150 mM de NaCl) par pétri de 10 cm de diamètre. Les lysats ont été incubés sur glace durant 20 minutes et centrifugés à 10,000xg durant 10 minutes à 4°C. Les surnageants protéiques ont été recueillis et conservés. Les concentrations des extraits protéiques ont été déterminées suivant la méthode de dosage de Lowry (Lowry



et al., 1951). Un volume de 1ml du réactif I (1 volume de cuivre/tartrate/carbonate + 2 volumes de 5% SDS + 1 volume de 800 mM NaOH) a été ajouté à 10  $\mu$ l des extraits protéiques et le tout a été incubé à 25°C durant 10 minutes. Après ce temps, 0.5 ml du réactif K (1 volume de folin + 5 volumes d'eau) a été ajouté au mélange et le tout a été incubé à 25°C durant 30 minutes. Les concentrations protéiques des échantillons ont été déterminées en comparant leur densité optique ( $\lambda=750\text{nm}$ ) à une courbe étalon d'albumine de sérum bovin.

### ***2.2.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant***

Les protéines ont été déposées sur un gel de 14% de polyacrylamide dénaturant (SDS) (Laemmli, 1970). L'électrophorèse a été effectuée dans le tampon contenant 190 mM Glycine, 25 mM Tris et 0.1% SDS à (pH 8.7) durant 18 heures à 4°C. Les protéines contenues dans le gel ont été électrotransférées sous tension de 50 volts sur des membranes Hybond C, (Amersham) dans le tampon contenant 25 mM Tris, 200 mM Glycine et 20% de méthanol, durant 2 heures à 4°C.

### 2.2.3 Immunodétection

Les membranes ont été préhybridées dans un tampon TBS (20 mM Tris-base, 137 mM chlorure de sodium, 0.1% Tween-20 pH7.6) additionné de 5% de lait écrémé durant 18 heures, à 4°C. Les membranes ont été lavées durant 20 minutes dans du TBS à 25°C. Les anticorps immuns primaires ont été ajoutés (dilution 1/1000) et l'hybridation a été réalisée à 25°C, sous agitation durant trois heures. Après ce temps, les membranes ont été rincées dans du TBS pour 20 minutes avant l'ajout des anticorps secondaires (dilution 1/5000) conjugués à la peroxydase durant deux heures, à 25°C. Des lavages de 45 minutes (4 lavages de 5min et 2 lavages de 10min) à 25°C ont suivi et la révélation du signal a été basée sur le système de "chemiluminescence" ECL (Amersham). Deux types d'anticorps immuns primaires ont été utilisés. Le premier est un anticorps polyclonal obtenu chez le mouton et spécifique à la MTHFS (fourni généreusement par Dr. Patrick Stover) (Girgis et al., 1997). Il reconnaît un peptide (**ca~~k~~rslrgelkqrlramsaeerlr**) localisé à l'extrémité N-terminale des isoformes MTHFS-1 et MTHFS-3. Le deuxième est un anticorps monoclonal (TS106) spécifique à la TS, fourni par Dr. Carmen Allegra (NIH, Bethesda,) (Drake et al., 1993).

### 2.3 Courbes de cytotoxicité au 5-fluorouracil et détection de l'activité enzymatique de la MTHFS

Des lignées cellulaires de neuroblastome 5Y type sauvages ou transformées avec l'ADNc de l'isoforme 1 de la MTHFS ont été fournies par Dr. Patrick Stover (Girgis et al., 1997). Les cellules ont été maintenues dans du milieu alpha-MEM complet (Gibco BRL), additionné de 10% de sérum de veau fœtal et de 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco-BRL). Pour certaines expériences, ce mélange a été suppléé de 5mM de sérine ou de 5mM de glycine. La culture a toujours été réalisée à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été maintenues à raison de 1x 10<sup>6</sup> cellules/ml. Les cellules ont été incubées avec différentes concentrations du 5-FU (10<sup>-16</sup>, 10<sup>-14</sup>, 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-4</sup> M) durant 5 jours. Les tapis cellulaires ont ensuite été lavés avec du PBS et trypsinisés. La trypsine a été inactivée en ajoutant 4 ml de milieu de culture alpha-MEM additionné de sérum de veau fœtal. Seules les cellules vivantes (20 µl) ont été comptées à l'aide d'un hémacytomètre par exclusion du bleu de trypan. Les suspensions cellulaires ont été centrifugées à 1000xg durant 5 minutes à 4°C. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 2 ml de PBS et séparé également en 2 tubes. Un des tubes a servi au dosage de l'activité enzymatique et l'autre à la détection de la MTHFS par immunodétection. L'activité enzymatique a été mesurée suivant la

formation d'un produit (le méthényltétrahydrofolate) issu de la réaction enzymatique catalysée par la MTHFS dans le tampon contenant 50 mM MES, 1.0 mM 2-mercaptoéthanol, 10 mM MgOAc, 100 mM ATP et 0.2 mM (6R, 6S)5-CHO-H<sub>4</sub>PteGlu (pH 6.3). Le produit est détecté par méthode spectrophotométrique à 360 nm et 1 unité d'activité enzymatique représente la formation de 1  $\mu$ mole de CH<sup>+</sup>-THF par minute. Les dosages protéiques ont été basés sur la méthode de Lowry décrite précédemment.

#### **2.4 Analyse des dérivés monocarbonés de l'acide folique**

Ces analyses ont été effectuées dans le laboratoire du Dr. David Priest (Medical University of South Carolina) d'après la méthode basée sur la formation du complexe ternaire entre le méthylènetétrahydrofolate, la thymidylate synthase et le [<sup>3</sup>H]F-dUMP (Priest et al., 1991). Cette méthode a servi à mesurer les niveaux intracellulaires du méthylènetétrahydrofolate et du 5-formyltétrahydrofolate. Les cellules ont été lavées avec du PBS froid et resuspendues dans du tampon d'extraction contenant 50 mM Tris-HCl, 50 mM ascorbate de sodium, 1 mM EDTA, et 0.25 M sucrose à pH 7.4. Les cellules (2-3 x 10<sup>7</sup> cellules/ml) ont été lysées par incubation à 100°C durant 5 minutes. Le mélange réactionnel de base pour l'analyse des différents dérivés réduits tétrahydrofolates a consisté à incuber 20 mU de thymidylate

tétrahydrofolates a consisté à incuber 20 mU de thymidylate synthase, 125 nM de [<sup>3</sup>H]F-dUMP (20 Ci/mmmole) dans le tampon réactionnel. La détection du CH<sub>2</sub>-THF a nécessité l'ajout de 2.0 mM de 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase et de 6.5 mM de formaldéhyde déacylase au mélange. La réaction a été incubée à 25°C durant 30 minutes. La réaction a été arrêtée par addition de 1% de SDS et par ébullition durant 5 minutes. Des aliquots de 25 µl ont été élués à travers des colonnes Séphadex G-25 de 400 µl. La radioactivité incorporée a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation où 250 désintégrations/minute/25µl sont équivalentes à la formation de 7 fmoles de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF retrouvé dans le complexe ternaire.

# **CHAPITRE 3**

## **RÉSULTATS**

### **3. RÉSULTATS**

#### **3.1 Quantification des différents isoformes de la MTHFS**

Des études exécutées par RT-PCR semi-quantitatif ont permis d'évaluer la distribution cellulaire et tissulaire des différents isoformes de la MTHFS. Des amorces spécifiques aux 5' des différents isoformes ont été utilisées conjointement avec une amorce commune située dans la région 3' des ADNc. La spécificité des produits de PCR a été démontrée par une hybridation de type "Southern". Les fragments obtenus ont la longueur attendue: MTHFS-1 (200pb); MTHFS-3 (280pb) et MTHFS-5 (370pb). La contamination des échantillons d'ARNs par de l'ADN génomique a été exclue suite à l'absence de bandes amplifiées par PCR avant l'étape de la transcription inverse. Les conditions d'analyse semi-quantitatives ont été déterminées par amplification de l'ADNc produit à partir d'ARN total de foie humain. Cet organe est caractérisé par une production importante des enzymes du cycle des folates. D'après des résultats antérieurs de buvardage "Northern", la MTHFS-1 est la plus fortement exprimée des 3 isoformes connus. Le nombre de cycles utilisés pour l'amplification des divers isoformes a donc été déterminé de façon à ce que l'amplification de l'isoforme MTHFS-1 demeure en phase logarithmique (25 cycles). Les résultats de RT-PCR indiquent que

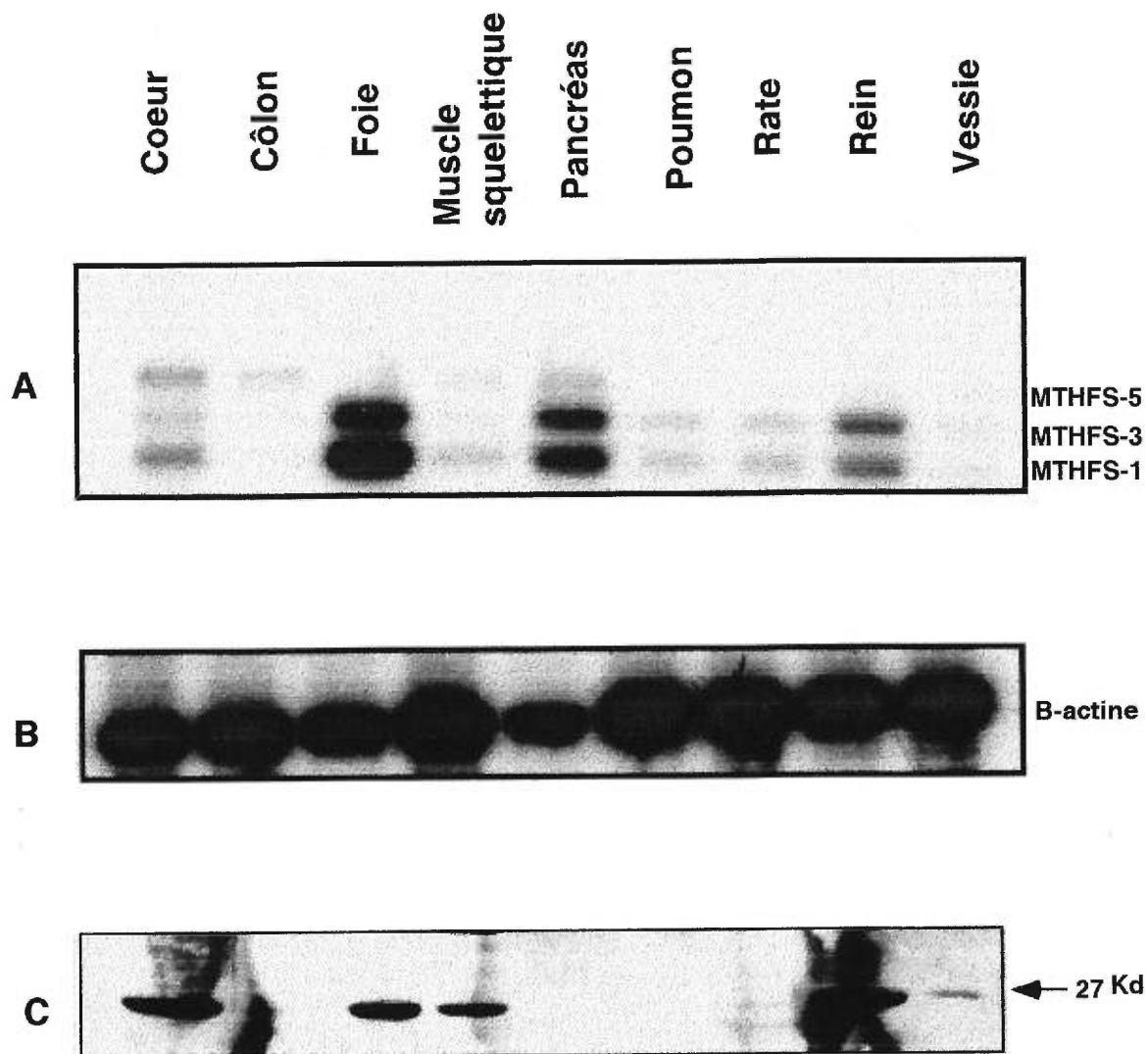
les isoformes MTHFS-1 et MTHFS-3 sont détectés à un niveau faible mais comparable dans tous les échantillons testés de tissus normaux et dans les lignées cellulaires à l'exception du foie. L'expression de l'isoforme MTHFS-5 varie selon l'échantillon et dans certaines lignées de cancer du côlon ou du sein, elle atteint un haut niveau (Figures 7 et 8, pages 44 et 45). On note donc une variabilité dans l'expression des 3 isoformes du gène de la MTHFS un par rapport aux autres mais aussi entre les différents tissus et lignées cellulaires testés.

### **3.2 Patron d'expression de la protéine MTHFS**

Nous avons cherché à corréliser les niveaux d'expression et de production de la protéine MTHFS avec les messagers et étudier sa distribution cellulaire et tissulaire. À cette fin, nous avons utilisé un anticorps polyclonal, produit chez le mouton et dont l'épitope est situé à l'extrémité N-terminale des isoformes MTHFS-1 et MTHFS-3. Dans une variété de tissus normaux, l'enzyme est détecté uniquement dans quelques tissus dont le cœur, le foie, le muscle squelettique, le rein et la vessie (Figure 7, page 44). Dans les lignées cellulaires cancéreuses, l'enzyme est détecté environ au même niveau dans toutes les cellules d'origine épithéliale (Figure 8, page 45). L'expression de la protéine varie donc selon le type cellulaire ou le tissu testé. Plus particulièrement, nous notons la



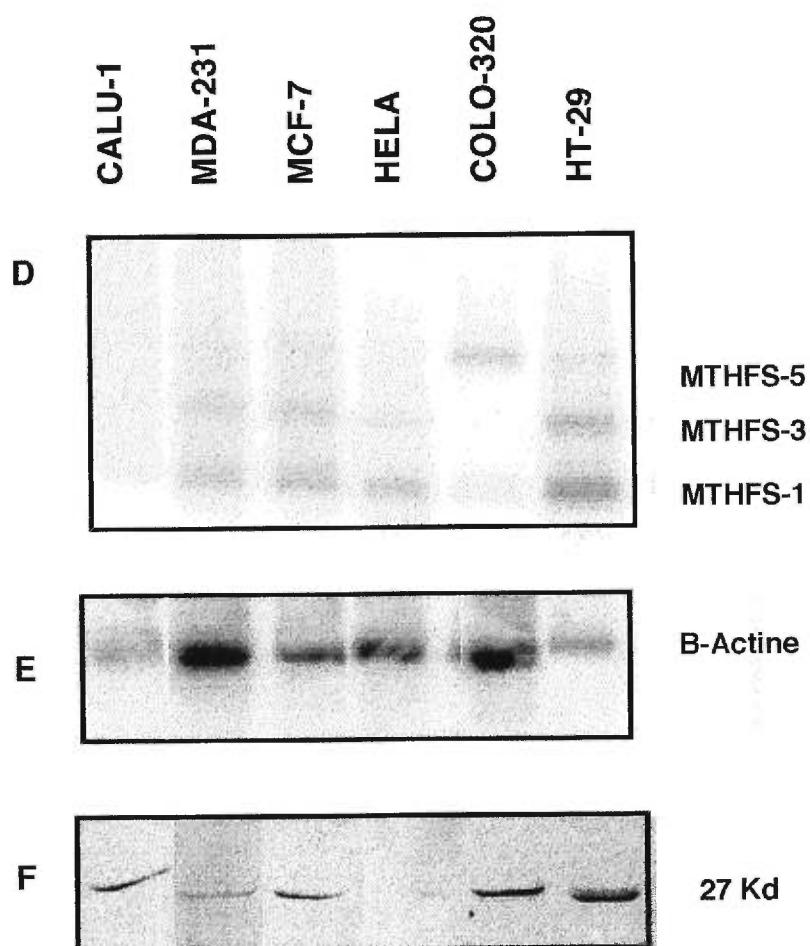
présence d'un doublet spécifique au niveau des lignées de cancer du côlon HT-29 et Colo-320 (Figure 8, page 45).



**Figure 7: Patron d'expression et de production de la MTHFS dans les tissus normaux humains**

Les panneaux A) et B) représentent les signaux obtenus, par RT-PCR, pour les 3 isoformes de la MTHFS et pour bêta-actine alors que le panneau C) représente les immunodétections pour la protéine MTHFS-1

**Figure 8: Patron d'expression en ARN messagers et en protéines des 3 isoformes de la MTHFS dans des lignées cellulaires humaines.**



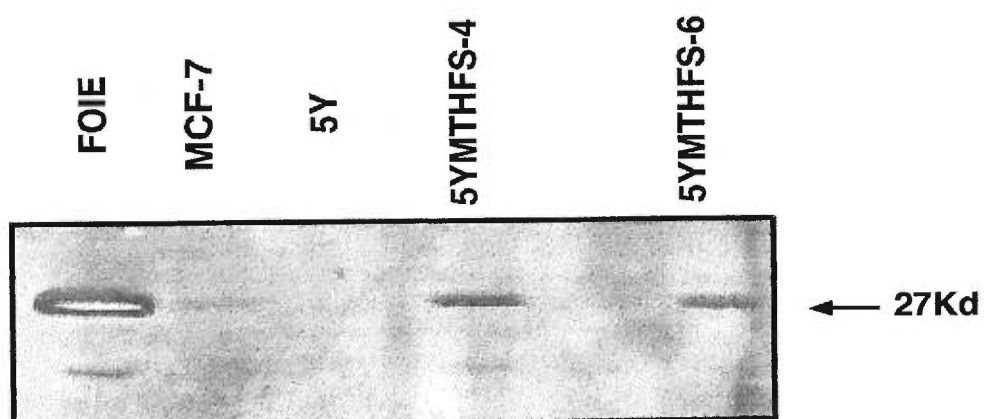
Les panneaux D et E) représentent les signaux obtenus, par RT-PCR, pour les 3 isoformes de la MTHFS et pour bêta-actine alors que le panneau F) représente les immunodétections pour la protéine MTHFS-1. **Calu-1**: cellules de cancer du poumon non petites, **MDA-231**, **MCF-7** et **ZR-75B**: cellules de cancer du sein, **Colo-320**, **HT-29**: cellules de cancer du côlon, **Hela**: cellule de cancer du col de l'utérus.

### 3.3 Courbes de cytotoxicité au 5-FU

La MTHFS pourrait constituer une étape limitante dans la conversion du 5-CHO-THF en CH<sub>2</sub>-THF et l'amélioration de la réponse aux protocoles de chimiothérapie associant le 5-FU et le leucovorin<sup>MD</sup> (5-CHO-THF). Nous avons donc essayé de déterminer les conséquences d'une surexpression de la MTHFS sur la cytotoxicité au 5-FU. La surexpression de la protéine MTHFS a été vérifiée par immunodétection. Dans les cellules transformées avec l'ADNc de la MTHFS-1 (5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6), une bande à 27Kd est détectée à la même hauteur que celle retrouvée dans le foie (servant de contrôle positif); cette bande est absente chez les cellules 5Y parentales (Figure 9, page 48). De plus, l'activité enzymatique MTHFS a été détectée uniquement dans les extraits protéiques obtenus à partir des transformés 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6. L'activité spécifique de la MTHFS a été calculée pour ces deux clones et est respectivement de 2100 et 2400 pmole/min/mg de protéines totales respectivement (Tableau II, page 54). Les courbes de cytotoxicité démontrent que la croissance des cellules parentales n'est diminuée qu'à partir de concentrations de 5-FU supérieures à 10<sup>-6</sup>M alors que la croissance des transformés est diminuée dès l'exposition à des concentrations de 5-FU égales à 10<sup>-14</sup> M. L'analyse des courbes de croissance indique que les transformés 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6 sont sensibles à des

concentrations de 5-FU environ 10,000 fois inférieures à celles des cellules 5Y parentales (Figure 10, page 49). Cet effet peut être renversé par l'ajout de 5mM de glycine au milieu de culture (Figure 12, page 50) alors qu'un enrichissement en sérine ne modifie pas les courbes de cytotoxicité générées par les 5Y et les 5YMTHFS-6 (Figure 13, page 51).

**Figure 9:** Immunodétection de la MTHFS dans les cellules 5Y, 5YMTHFS-4, 5YMTHFS-6, MCF-7 et le foie humain.

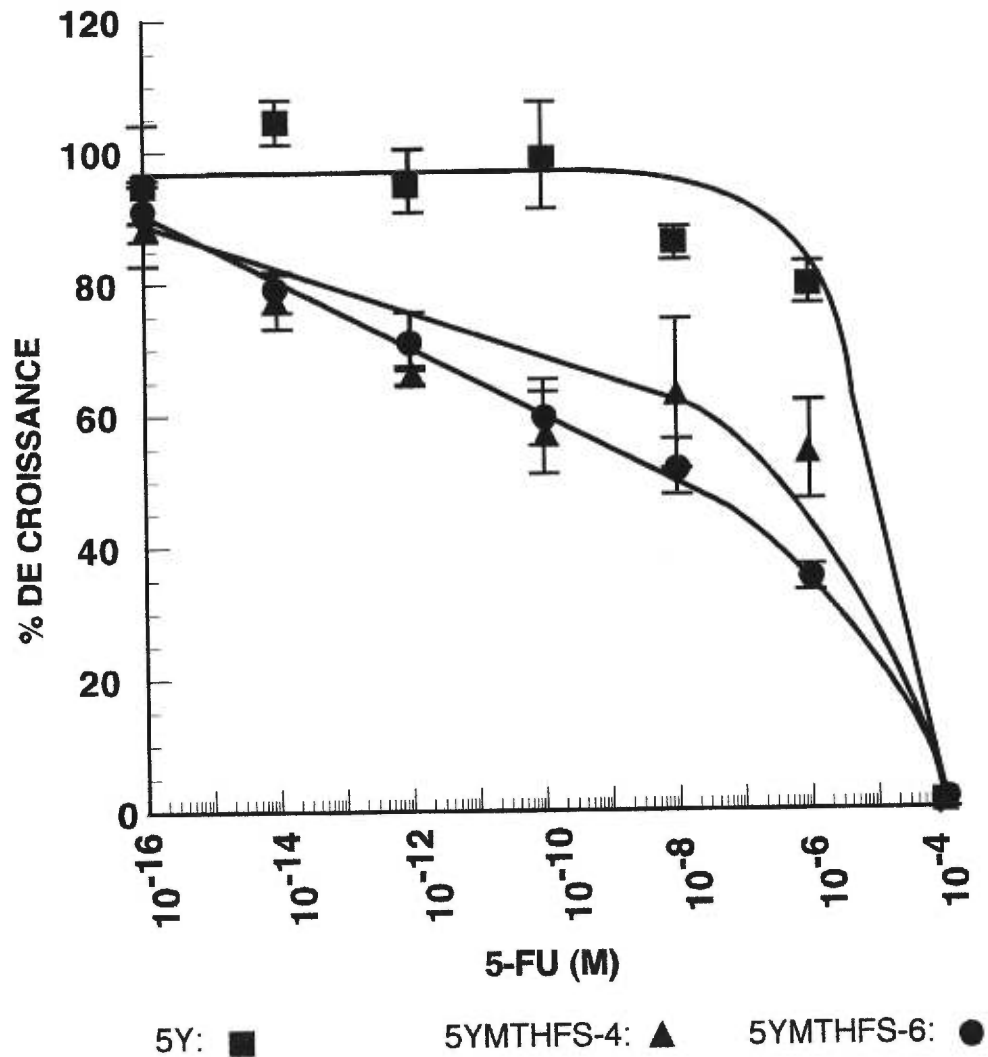


**MCF-7:** lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire humain

**5Y:** lignée cellulaire de neuroblastome humain

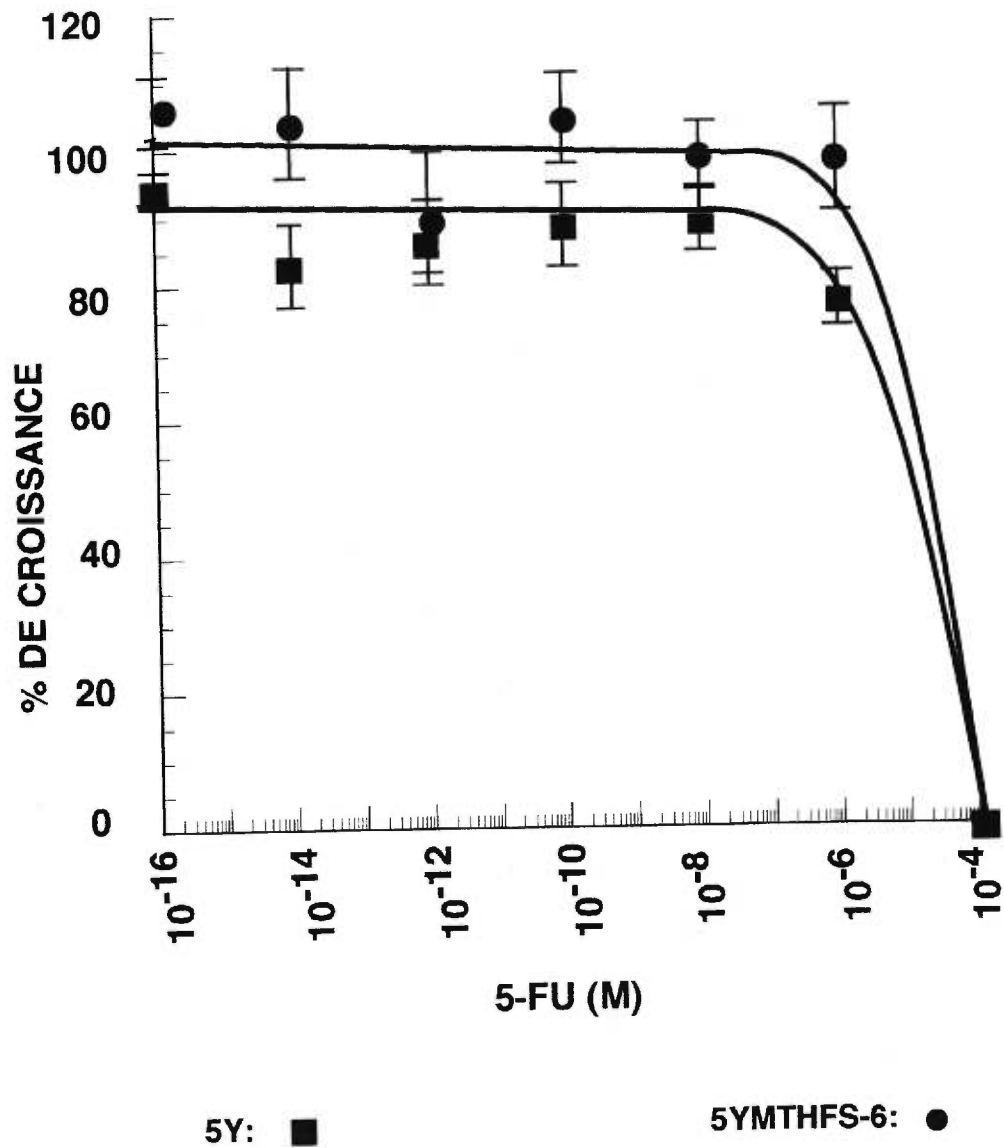
**5YMTHFS-4 et 6:** lignées cellulaires de neuroblastome humain transformées avec l'ADN complémentaire de la MTHFS-1

**Figure 10 :** Les courbes de cytotoxicité au 5-FU dans les cellules 5Y, 5YMT HFS-4 et 5YMT HFS-6.



Les cellules de neuroblastome humain 5Y et les transformés 5YMT HFS-4 et 5YMT HFS-6 ont été soumis à une exposition continue de 5-FU dans du milieu alpha-MEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal. Le compte cellulaire a été réalisé après 5 jours d'incubation. Les résultats représentent la moyenne et l'erreur standard de 3 expériences individuelles effectuées chacune en triplicata.

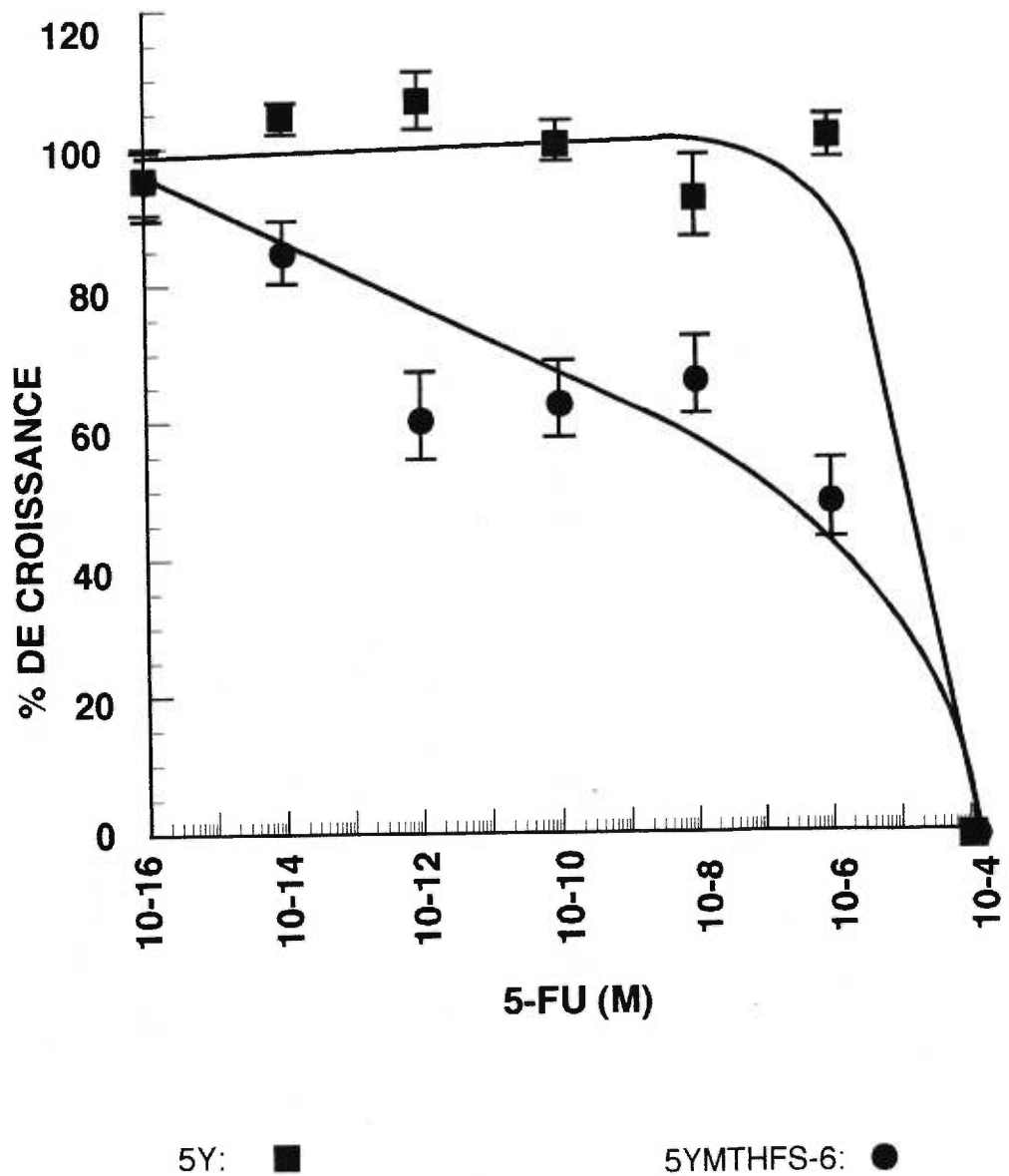
**Figure 12:** Effet de la glycine sur la cytotoxicité au 5-FU dans les cellules 5Y et 5YMT HFS-6.



Les cellules 5Y et les transformés 5YMT HFS-6 ont été cultivés dans du milieu de culture additionné de 5mM de glycine.



**Figure 13:** Effet de la sérine sur la cytotoxicité au 5-FU dans les cellules 5Y et 5YMT HFS-6.

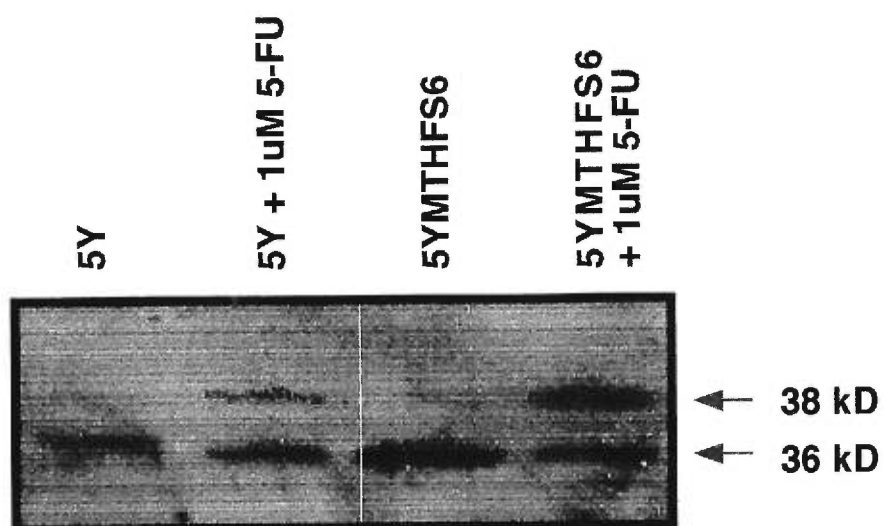


Les cellules 5Y et les transformés 5YMT HFS-6 ont été cultivés dans du milieu de culture additionné de 5mM de sérine.

### 3.4 Détection du complexe F-dUMP-TS-CH<sub>2</sub>-THF

Dans la cellule, le 5-FU est métabolisé en 5F-dUMP. C'est ce dernier qui constitue l'agent actif dans l'inhibition de la TS. Après s'être lié à la TS, le 5F-dUMP forme un complexe ternaire avec le CH<sub>2</sub>-THF. La formation du complexe ternaire est détectée par un anticorps monoclonal spécifique à la TS. Le complexe ternaire formé migre à un poids moléculaire de 38kd sur un gel de polyacrylamide alors que la thymidylate synthase libre migre à un poids moléculaire de 36kd (Drake et al., 1993). Les résultats d'immunodétection avec cet anticorps monoclonal démontrent que le complexe ternaire est enrichi, par rapport à la TS libre, dans les transfectants 5YMTHFS-6, indiquant l'augmentation de la quantité du complexe ternaire formé dans ces cellules (Figure. 11, page 53). Le dosage des CH<sub>2</sub>-THF révèle une nette augmentation de ses concentrations intracellulaires dans les 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6 par rapport aux cellules 5Y parentales (Tableau III, page 54).

**Figure 11: Immunodétection de la thymidylate synthase dans les cellules 5Y et 5YMTTHFS-6.**



Les cellules 5Y et les transformés 5YMTTHFS-6 ont été incubés en présence de  $10^{-6}$ M de 5-FU pendant 24 heures.

**Tableau II: Analyse de l'activité enzymatique de la MTHFS dans les cellules 5Y, 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6.**

<b>Échantillons</b>	<b>Activité enzymatique MTHFS (pmol/min/mg de protéines totales)</b>
<b>5Y</b>	non-déTECTABLE
<b>5YMTHFS-4</b>	2100
<b>5YMTHFS-6</b>	2400

n=3

**Tableau III: Analyse des concentrations de deux cofacteurs tétrahydrofolates dans les cellules 5Y, 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6.**

<b>Échantillons</b>	<b>Folates réduits (pmol/min/mg de protéines totales)</b>	
	<b>5-CHO-THF</b>	<b>CH<sub>2</sub>-THF</b>
<b>5Y</b>	2.7 + 0.2	0.6 + 0.1
<b>5YMTHFS-4</b>	< 1	2.2 + 0.1
<b>5YMTHFS-6</b>	< 1	6.9 + 0.1

n=3

5-CHO-THF: 5-formyltétrahydrofolate; CH<sub>2</sub>-THF: méthylènetétrahydrofolate

# **CHAPITRE 4**

## **DISCUSSION**

## 4. DISCUSSION

### 4.1 Patron d'expression de la protéine MTHFS

Nous avons démontré la présence de la protéine MTHFS dans certains tissus ainsi que dans l'ensemble des lignées cellulaires d'origine épithéliale analysés. On note une variation des niveaux de cette protéine dans les tissus normaux où elle est détectée. Une variation similaire est observée dans les lignées cellulaires. Toutefois pour ces dernières, les niveaux sont généralement inférieurs à ceux obtenus dans les tissus. Dans la plupart des échantillons, on observe la présence d'une bande migrant à un poids moléculaire de 27Kd. Cependant, un doublet, migrant à 27 et 29Kd, est détecté au niveau des lignées de cancer du côlon, les HT-29 et Colo-320. La bande additionnelle détectée pourrait être un isoforme de la MTHFS. En comparant les séquences en acides aminés des trois isoformes de la MTHFS, on constate que les isoformes MTHFS-1 et MTHFS-3 partagent l'épitope reconnu par l'anticorps polyclonal utilisé. La MTHFS-3 possède une insertion de 25 acides aminés qui lui donne un gain de 2Kd par rapport au MTHFS-1, ce qui pourrait correspondre à la différence de poids moléculaire observée dans le doublet. Présentement, on ne possède aucune preuve cependant que la bande à 29Kd correspond à l'isoforme 3.

Des études d'expression de cet isoforme sont en cours.

L'isoforme MTHFS-5 n'est pas reconnu par l'anticorps employé car le peptide situé au niveau de la partie N-terminale est différent. De plus, nous ne disposons d'aucun anticorps capable de détecter d'éventuelles protéines produites par cet ARNm.

#### ***4.1.1 Expression de la MTHFS dans les tissus normaux***

Le foie et le rein sont caractérisés par une production importante des enzymes du cycle des folates (Yoshida et Kikuchi, 1973). Le foie est considéré comme le site principal du métabolisme des acides aminés, des purines et des pyrimidines. Ces voies métaboliques sont contrôlées par les enzymes du cycle des folates et leurs substrats qui jouent un rôle de coenzymes dans le transfert des unités monocarbonées. La MTHFS est aussi détectée dans le tissu musculaire strié (muscle squelettique, cœur). Ce tissu a une consommation énergétique importante supportée par un grand nombre de mitochondries. La MTHFS possède une isoforme mitochondriale (MTHFSm) et une isoforme cytoplasmique (MTHFSc) (Bertrand et al., 1995). Ces 2 isoformes migrent à la même hauteur et partagent le même épitope. Il est alors possible que les signaux observés dans le tissu musculaire soient attribuables à la MTHFS mitochondriale.

#### **4.1.2 Expression de la MTHFS dans les lignées cellulaires**

La MTHFS est détectée dans les lignées cellulaires d'origine épithéliale. Les lignées cellulaires, contrairement aux tissus normaux, ont un pourcentage élevé de cellules qui traversent le cycle cellulaire. La réplication d'ADN de ces lignées nécessite la présence de l'acide thymidylique (dTMP). Le dTMP est obtenu par deux voies enzymatiques. La première voie est catalysée par la thymidylate synthase (TS). Cette voie représente la voie *de novo* des pyrimidines. La deuxième voie est contrôlée par la thymidine kinase (TK) qui recycle la thymidine en dTMP.

Des résultats antérieurs ont démontré que la MTHFS n'était pas détectable par immunodétection dans les lignées d'origine lymphoïde. Généralement, ces lignées sont caractérisées par un taux de division élevé. Il a été démontré que l'activité de la TK est proportionnelle à l'état de prolifération de la cellule. La TK, dans ces conditions, pourrait être plus active que la TS et contrôler préférentiellement la production du dTMP.

#### **4.2 Absence de corrélation entre les niveaux des messagers et des protéines**

Nous avons tenté de corréler les niveaux des messagers et de



protéine MTHFS. À cette fin, des études de RT-PCR semi-quantitatives ont été entreprises pour les trois isoformes dans tous les échantillons utilisés précédemment. Aucune corrélation évidente n'existe entre les niveaux des protéines et des messagers, suggérant probablement la présence d'un contrôle post-transcriptionnel. Ce type de contrôle a déjà été observé au niveau de la régulation de l'expression des gènes de certains enzymes du cycle des folates. La folylpolyglutamate synthétase (FPGS) a l'expression de son gène régulée en interférant avec la stabilité de son messenger (Egan et al., 1995). D'autres comme la thymidylate synthase, inhibent la traduction de leur messenger en se liant à un site spécifique au niveau de leur segment 5' non-traduit (Chu et Allegra, 1996; Chu et al., 1993). Compte tenu de nos résultats, il sera alors intéressant de vérifier le potentiel de traductibilité du messenger de la MTHFS. Entre l'inhibition de la traduction par attachement de facteurs (protéines, peptides ou autres) et la dégradation spécifique des ARNm, le plus simple serait de tester la traductibilité du messenger isolé dans des conditions permettant de séparer les ARNm d'éventuels facteurs protéiques. Dans ces conditions, une production de protéines dans des lysats de réticulocytes indique qu'ils sont traductibles et non dégradés. Cette étude préliminaire permettra d'orienter des études plus poussées vers la stabilité du messenger ou sa traductibilité.

### 4.3 Surexpression de la MTHFS et cytotoxicité au 5-FU

La deuxième partie de ce projet a porté sur l'étude de la cytotoxicité au 5-FU suite à une surexpression de la MTHFS. Cette étude a été réalisée chez des cellules de neuroblastome 5Y. Les 5Y n'ont pas de niveau basal détectable de MTHFS. Elles ont donc été transformées de façon à surexprimer la MTHFS. Le groupe du Dr. Stover les ont utilisées pour étudier le rôle physiologique du 5-CHO-THF. Ces études ont démontré qu'une surexpression de la MTHFS entraîne une diminution des concentrations intracellulaires du 5-CHO-THF, libérant ainsi les sites actifs de la SHMT. Ceci a pour conséquence de diminuer les concentrations du CH<sub>3</sub>-THF et empêcher la reméthylation de l'homocystéine en méthionine dans un milieu de culture riche en glycine. Selon ces résultats, la diminution des concentrations de méthionine pourrait induire l'inhibition de la traduction de protéines requises lors du cycle cellulaire et entraîner l'arrêt de la réplication de l'ADN, d'où une diminution de croissance cellulaire de 30 à 40%. Dr. Stover suggère que la conversion de la sérine en glycine favorise également la production du THF aux dépens du CH<sub>2</sub>-THF. En conséquence, la diminution des concentrations intracellulaires du CH<sub>2</sub>-THF rendrait les cellules réfractaires à la chimiothérapie au 5-FU.

Nous avons utilisé ces cellules pour évaluer la réponse des cellules tumorales au traitement chimiothérapeutique employant le 5-FU. Les cellules parentales 5Y et les transformés 5YMTHFS-6 et 5YMTHFS-4, ont été cultivés dans des milieux de culture complets avec 10% de sérum de veau fœtal non-dialysé pour mieux approximer les conditions physiologiques. Dans ces conditions plus riches en sérine que celles utilisées par Dr. Stover, l'analyse des taux des différents folates réduits, chez les lignées transfectées 5YMTHFS-4 et 5YMTHFS-6, démontre une augmentation de 4.5 et de 10 fois des taux de CH<sub>2</sub>-THF par rapport aux cellules 5Y de type sauvage. L'augmentation des taux endogènes du CH<sub>2</sub>-THF a pour conséquence de renforcer la stabilité du complexe ternaire formé entre la TS, le CH<sub>2</sub>-THF et le 5F-dUMP, interférant avec la réplication de l'ADN, la division cellulaire et menant à la mort de la cellule tumorale. Selon ce modèle, un enrichissement du complexe ternaire devrait être observé chez les transformants par rapport aux cellules parentales 5Y. Les résultats de la figure 9 démontrent bien ce point. Dès les concentrations de 5-FU égales à 10<sup>-14</sup>M, les cellules 5YMTHFS-6 et 5YMTHFS-4 présentent une diminution de la croissance comparativement aux cellules 5Y parentales non-modifiées. De plus, la réponse de ces deux transfectants est directement proportionnelle à la concentration de 5-FU. Les clones 5YMTHFS-6 et 5YMTHFS-4 présentent des courbes de cytotoxicité similaires, associant l'effet observé sur la

survie à la surexpression de la MTHFS. En saturant les milieux de culture en glycine cependant, les cellules redeviennent résistantes au 5-FU tel qu'observé dans la figure 10. Ces conditions expérimentales entraînent probablement une diminution des concentrations cytoplasmiques de  $\text{CH}_2\text{-THF}$  et une augmentation du THF. La baisse de la concentration de  $\text{CH}_2\text{-THF}$  limiterait la formation du complexe ternaire entraînant une résistance au 5-FU. De plus, un ajout de sérine ne parvient pas à potentialiser la réponse originale des 5YMTHFS-6 au 5-FU. Ceci suggère que la voie métabolique catalysée par la SHMT est déjà saturée en sérine.

Il est donc clair que chez les cellules 5YMTHFS-6, la réaction de conversion de la sérine en glycine par la SHMT est une réaction contrôlée à la fois par le 5-CHO-THF lié à ses sites actifs et les concentrations de sérine et de glycine (Kohl et al., 1980). Il a été démontré que les mitochondries de cette lignée présentent une activité enzymatique responsable de la synthèse intramitochondriale de la sérine à partir de la glycine. Cette activité est réalisée par un complexe protéique nommé le *Glycine Cleavage System (GCS)* (Sato et al., 1991). Dans la mitochondrie, le métabolisme de la sérine/glycine est régulé par la SHMTm et le GCS. Le GCS conjointement avec la SHMTm catalysent la synthèse d'un équivalent de sérine à partir de deux équivalents de glycine. Ces réactions permettent de générer des unités monocarbonées dans la mitochondrie et de faire de la sérine qui sera également une source

d'unités monocarbonées pour le métabolisme des folates cytoplasmiques. Dans le cytoplasme, l'entrée dans le métabolisme des unités monocarbonées est assurée par la SHMTc. L'activité de la SHMTc est régulée par les concentrations intracellulaires du 5-CHO-THF. Physiologiquement, seules les concentrations intracellulaires du 5-CHO-THF sont régulées par la MTHFS (Girgis et al., 1997). La surexpression de la MTHFS, dans les cellules de neuroblastome, conduit à une accumulation du CH<sub>2</sub>-THF et une augmentation de la stabilité du complexe ternaire. Dans ces conditions, la MTHFS serait l'étape limitante dans l'accumulation du CH<sub>2</sub>-THF et pourrait avoir une incidence thérapeutique.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**Bertrand R., Beauchemin M., Dayan A., Ouimet M., Jolivet J.** *Identification and characterization of human mitochondrial methenyltetrahydrofolate synthetase activity.* Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1266(3) : 245-249

**Bertrand R., Jolivet J.** *Methenyltetrahydrofolate synthetase prevents the inhibition of phosphoribosyl 5-aminoimidazole 4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase.* J. Biol. Chem., 1989b, 264(15) : 8843-8846

**Bertrand R., MacKenzie R. E., and Jolivet J.** *Human liver methenyltetrahydrofolate synthetase: improved purification and increased affinity for folate polyglutamate synthetase.* Biochimica et Biophysica Acta, 1987, 911: 154-161

**Buchanan J.M.** *Covalent reaction of substrates and antimetabolites with formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase.* Methods Enzymol., 1982, 87 : 76-84

**Chazal M., Cheradame S.L.F.J., Francoural M., Formento P., Etienne M.C., Francois E., Richelme H., Mousseau M., Letoublon C., Pezet D., Cure H., Seitz J.F., and Milano G.** *Decreased folylpolyglutamate synthetase activity in tumors resistant to fluorouracil/folinic acid treatment.* *Clinical Cancer Research*, 1997, 3: 553-557

**Cheradame S., Etienne M.C., Formento P., Schneider M., Dassonville O., Demard F., and Milano G.** *Tumoral reduced folates and clinical resistance to fluorouracil based treatment in head and neck cancer patients.* *J. Clin. Oncol.*, 1997, 15 : 2604-2610

**Chirgwin J.J., Przbyla A.E., MacDonald R.J., and Ruther W.J.** *Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.* *Biochemistry*, 1979, 18 : 5294

**Chu E., and Allegra C.J.** *The role of thymidylate synthase in cellular regulation.* *Advan. Enzyme. Regul.*, 1996, 36 : 143-163

**Chu E., Voeller D., Koeller D.M., Drake J.C., Takimoto C.H., Maley G.F., Maley F., and Allegra C.J.** *Identification of an RNA binding site for human thymidylate synthase.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90 : 517-521



**Danenberg P.V.** *Thymidylate synthase: a target enzyme in cancer chemotherapy.* Biochim. Biophys. Acta, 1977, 473(2) : 73-92

**Davis H.L.** *Chemotherapy of large bowel cancer.* Cancer, 1982, 50: 2638

**Dayan A., Bertrand R., Beauchemin M., Chahla D., Mamo A., Filion M., Skup D., Massie B., and Jolivet J.** *Cloning and characterization of the human 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase encoding cDNA.* Gene, 1995, 165(2) : 307-311

**Drake J.C., Allegra C.J., and Johnston P.G.** *Immunological quantitation of thymidylate synthase-FdUMP-methylene-tetrahydrofolate ternary complex with the monoclonal antibody.* Anti-cancer drugs, 1993, 4: 431-435

**Eells J.T., Black K.A., Makar A.B., Tedford C.E., and Tephly T.R.** *The regulation of one-carbon oxidation in the rat by nitrous oxide and methionine.* Arch. Biochem. Biophys., 1982, 219(2): 316-326

**Egan M.G., Sirlin S., Rumberger B.G., Garrow T.A., Shane B., Sirotiak F.M.** *Rapid decline in folypolyglutamate synthetase activity and gene expression during maturation in HL-60 cells.* J. Biol. Chem., 1995, 270(10) : 5462-5468

**Etienne M.C., Guillot T., Milano G.** *Critical factors for optimizing the 5-fluorouracil-folinic acid association in cancer chemotherapy* Annals of Oncology, 1996, 7: 283-289

**Evans R.M., Laskin J.D., and Hakala M.T.** *Effects of excess folates and deoxyinosine on the activity of and site of action of 5-fluorouracil.* Cancer Res., 1981, 41: 3288

**Friedkin M.** *Thymidylate synthetase.* Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 1973, 38 : 235-292

**Girgis S., Suh J.R., Jolivet J., Stover P.J.** *5-formyltetrahydrofolate regulates homocysteine remethylation in human neuroblastoma.* J. Biol. Chem., 1997, 272(8) : 4729-4734

**Greenberg D.M., Wynston L.K., and Nagabhusshanama A.** *Further studies on N5-formyltetrahydrofolic acid cyclo-dehydrase.* Bioch, 1965, 4: 1872-1878

**Grimshaw C.E., Henderson G.B., Soppe G.G., Hansen G., Mathur E.J., and Huennekens F.M.** *Purification and properties of 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase from Lactobacillus casei.* J. Biol. Chem., 1984, 259: 2728-2733

**Heidelberger C., Danenberg P.V., and Moran R.G.** *Advances in enzymology and related areas in molecular biology* Meister A. Ed, John Wiley and Sons, 57-119, 1983

**Herbert V.** *The 1986 Herman award lecture. Nutrition science as a continually unfolding story: the folate and vitamin B-12 paradigm.* Am. J. Clin. Nutr., 1987, 46(3): 387-402

**Hitchings G.H.** *Inhibition of folate metabolism in chemotherapy,* Berlin Springer-Verlag, 1983

**Hitchings G.H., and Roth B.** *Enzyme inhibitors as drugs,* Baltimore Maryland, Univ. Park Press, 263-280, 1983

**Hopkins S., and Schirch V.** *5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase: purification and properties of the enzyme from rabbit liver.* J. Biol. Chem., 1984, 259: 5618-5622

**Houghton J.A., Maroda S.J., Phillips J.O., and Houghton P.J.** *Biochemical determinants of responsiveness to 5-fluorouracil and its derivatives in xenografts of human adenocarcinomas in mice.* Cancer Res., 1981, 41: 144

**Jägerstad M., Akesson B., and Fehling C.** *Effect of methionine on the metabolic fate of liver folates in vitamin B12-deficient rats.* Br. J. Nutr., 1980, 44: 361-369

**Johnston P.G., Lenz H.J., Leichman C.G., Danenberg K.D., Allegra C.J., Danenberg P.V., and Leichman L.** *Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors.* Cancer Research, 1995, 55: 1407-1412

**Johnston P.G., Liang C., Henry S., Chabner B.A., and Allegra C.J.** *Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissues.* Cancer Research, 1991, 51: 6668-6676

**Johnston P.G., Mick R., Recant W., Behan K.A., Dolan M.E., Ratain M.J., Beckman E., Weichselbaun R.R., Allegra C.J., and Vokes E.E.** *Thymidylate synthase expression and response to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer.* J Natl Cancer Inst, 1997, 89: 308-13

**Kisliuk R.L.** *Pteroylglutamates.* Molecular and Cellular Biochemistry, 1981, 39: 331-345

**Kohl R.L., Perez-Polo J.R., Quay W.B.** *Effect of methionine, glycine and serine on serine hydroxymethyltransferase activity in rat glioma and human neuroblastoma cells* Journal of Neuroscience Research, 1980, 5: 271-280

**Krebs H.A., Hems R., and Tyler B.** *The regulation of folate and methionine metabolism.* Biochem. J., 1976, 158: 341-353

**Kruschwitz H.L., McDonald D., Cossin E.A., Schirch V.** *5-formyltetrahydropteroylglutamates are the major folate derivatives in Neurospora crassa conidiospores* Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(46): 28757-28763

**Laemmli U.K.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970, 227 : 680-685

**Langenbach R.J., Danenberg P.V., and Heidelberger C.** *Thymidylate synthetase : mechanism of inhibition by 5-fluoro-2'-deoxyuridylate.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, 48: 1565

**Leichman L., Lenz H.J., Leichman C.G., Groshen S., Danenberg K., Baranda J., Spears C.P., Boswell W., Silberman H., and Ortega A.** *Quantitation of intratumoral thymidylate synthetase expression predicts for resistance to protracted infusion of 5-fluorouracil and weekly leucovorin in disseminated colorectal cancer: preliminary report from an original trial.* European Journal of Cancer, 1995, 31A: 1306-10

**Lenz H.J., Leichman C.G., Danenberg K.D., Danenberg P.V., Groshen S., Cohen H., Laine L., Crooker P., Silberman H., Baranda J., Garcia Y., Li J., and Leichman L.** *Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach, a predictor for primary tumor response and overall survival.* J Clin Oncol, 1996, 14: 176-82

**Livingston R.B., and Carter S.** *Single agents in cancer chemotherapy.* Plenum, New York , 1970, 195-256

**Lowe K.E., Osborne C.B., Lin B.-F., Kim J.-S., Hsu J.-C., and Shane B.** *Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells.* J. Biol. Chem., 1993, 268: 21665-21673

**Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J.** *Protein measurement with folin phenol reagent.* J. Biol. Chem., 1951, 193 : 265-275

**Lucchini G., and Bianchetti R.** *Initiation of protein synthesis in isolated mitochondria and chloroplasts.* Biochim. Biophys. Acta, 1980, 608 : 54-61

**Matherly L.H., Czajkowski C.A., Muench S.P., Psiakis J.T.** *Role of cytosolic folate-binding proteins in the compartmentation of endogenous tetrahydrofolates and the 5-formyltetrahydrofolate-mediated enhancement of 5-fluoro-2'-deoxyuridine antitumor activity in vitro.* Cancer Res., 1990, 50(11) : 3262-3269

**Mullin R.J., Keith B.R., and Duch D.S.** *Distribution and metabolism of calcium leucovorin in normal and tumor tissue.* Adv. Exp. Med. Biol., 1988, 244: 25-38

**Paternack L.B., Laude Da Jr., and Appling D.R.** *<sup>13</sup>C NMR analysis of intercompartmental flow of one-carbon units into choline and purines in Saccharomyces cerevisiae.* Biochemistry, 1994, 33(1) : 74-82

**Pasternack L.B., Laude Da Jr., and Appling D.R.** *Whole cell detection by <sup>13</sup>CNMR of metabolic flux through the C1-tetrahydrofolate synthase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system and effect of antifolate exposure in Saccharomyces cerevisiae.* Biochemistry, 1994, 33(23) : 7166-7173

**Priest D.G., Schmitz J.C., Bunni M.A., and Stuart R.K.** *Pharmacokinetics of leucovorin metabolites in human plasma as a function of dose administered orally and intravenously.* J. Natl. Cancer Inst., 1991, 83: 1806-1812

**Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T.** *Molecular cloning : a laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989



**Santi D.V., and McHenry C.S.** *5-fluoro-2'-deoxyuridylate: covalent complex with thymidylate synthetase.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1972, 69: 1855

**Sato K., Yoshida S., Fujiwara K., Tada K., and Tohyama M.** *Glycine cleavage system in astrocytes.* Brain Res., 1991, 567: 64-70

**Schirch L.** *Serine hydroxymethyltransferase.* Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 1982, 53 : 83-112

**Schirch L.** *Folates in serine and glycine metabolism.* R.L. Blakley and S.J. Benkovic Eds, New York : John Wiley and Sons, Folates and pterins, 1 : 399-431, 1984

**Schirch V., and Strong W.B.** *Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism.* Archives of Biochemistry & Biophysics, 1989,. 269: 371-80

**Shane B., Stokstad E.L.** *The interrelationships among folate, vitamin B12, and methionine metabolism.* Adv. Nutr. Res., 1983, 5 : 133-170

**Ullman B., Lee M., Martin D.W., and Santi D.V.** *Cytotoxicity of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate: requirement for reduced folate cofactors and antagonism by methotrexate.* Proc. Natl. Acad. Sci., 1978, 75: 980

**Wang F.-S., Aschele C., Sobrero A., Chang Y.-M., and Bertino J. R.** *Decreased folylpolyglutamate synthetase expression: a novel mechanism of fluorouracil resistance.* Cancer Research, 1993, 53: 3677-3680

**Yoshida T., and Kikuchi G.** *Major pathways of serine and glycine catabolism in various organs of the rat and cock.* J. Biochem. (Tokyo), 1973, 73: 1013-1022

**Zamierowski M.M., and Wagner C.** *High molecular weight complexes of folic acid in mammalian tissues.* Biochem. Biophys. Res. Commun, 1974, 60: 81-87