

Académie d'Orléans-Tours  
Université François-Rabelais

## FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2011

N°

### MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément à l'arrêté du 10 septembre 1990,  
tient lieu de

### THESE pour le DOCTORAT EN MEDECINE Diplôme d'Etat

Par Jean Baraud  
Né le 9 mars 1983 à Paris

Présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 2011

## Implication de NRF2 dans le métabolisme oxydatif des cellules leucémiques

### Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Christian Binet  
Membres du jury : Monsieur le Professeur Jorge Domenech  
Monsieur le Professeur Olivier Hérault  
Monsieur le Professeur Jean-Christophe Pagès

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS  
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**DOYEN**

**Professeur Dominique PERROTIN**

**VICE-DOYEN**

Professeur Daniel ALISON

**ASSESEURS**

Professeur Christian ANDRES, Recherche  
Docteur Brigitte ARBEILLE, Moyens  
Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue  
Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie  
Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

**SECRETAIRE GENERALE**

Madame Fanny BOBLETER

\*\*\*\*\*

**DOYENS HONORAIRES**

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966  
*Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962*  
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972  
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994  
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

**PROFESSEURS EMERITES**

Professeur Alain AUTRET  
Professeur Jean-Claude BESNARD  
Professeur Patrick CHOUTET  
Professeur Guy GINIES  
Professeur Olivier LE FLOCH  
Professeur Chantal MAURAGE  
Professeur Léandre POURCELOT  
Professeur Michel ROBERT  
Professeur Jean-Claude ROLLAND

**PROFESSEURS HONORAIRES**

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS - J. BARSOTTI  
A. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI  
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – M. JAN –P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC  
J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTRE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H. METMAN  
J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph. RAYNAUD  
Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE - M.J. THARANNE  
J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme	AUTRET-LECA Elisabeth	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
MM.	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mmes	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
	BARTHELEMY Catherine	Physiologie
MM.	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	CHARBONNIER Bernard	Cardiologie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FETISSOF Franck	Anatomie et Cytologie pathologiques
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique)
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LANSON Yves	Urologie
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Pierre	Endocrinologie et Maladies métaboliques
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

	LEMARIE Etienne	Pneumologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-Vénérologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénérologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	NIVET Hubert	Néphrologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	RICHARD-LENOBLE Dominique	Parasitologie et Mycologie
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
	TOUTAIN Annick	Génétique
	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénérologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

### **PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie Médecine Générale

### **PROFESSEURS ASSOCIES**

MM. HUAS Dominique Médecine Générale  
LEBEAU Jean-Pierre Médecine Générale  
MALLET Donatien Soins palliatifs  
POTIER Alain Médecine Générale

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme ARBEILLE Brigitte Biologie cellulaire  
M. BARON Christophe Immunologie  
Mme BAULIEU Françoise Biophysique et Médecine nucléaire  
M. BERTRAND Philippe Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication  
Mme BLANCHARD-LAUMONIER Emmanuelle Biologie cellulaire  
M BOISSINOT Eric Physiologie  
MM. BRILHAULT Jean Chirurgie orthopédique et traumatologique  
CORTESE Samuele Pédiopsychiatrie  
Mmes DUFOUR Diane Biophysique et Médecine nucléaire  
EDER Véronique Biophysique et Médecine nucléaire  
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie Anatomie et Cytologie pathologiques  
GAUDY-GRAFFIN Catherine Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière  
M. GIRAUDEAU Bruno Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication  
Mme GOUILLEUX Valérie Immunologie  
MM. GUERIF Fabrice Biologie et Médecine du développement et de la reproduction  
GYAN Emmanuel Hématologie, transfusion  
M. HOARAU Cyrille Immunologie  
M. HOURIOUX Christophe Biologie cellulaire

Mme	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
Mmes	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et Cytologie pathologiques
MM.	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
M.M	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

#### **MAITRES DE CONFERENCES**

Mlle	BOIRON Michèle	Sciences du Médicament
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mlle	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE**

M.	ROBERT Jean	Médecine Générale
----	-------------	-------------------

#### **CHERCHEURS C.N.R.S. - INSERM**

MM.	BIGOT Yves	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
MM.	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – U 618
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM.	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – U 618
Mmes	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	POULIN Ghislaine	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

#### **CHARGES D'ENSEIGNEMENT**

##### ***Pour l'Ecole d'Orthophonie***

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
M	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
M.	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

##### ***Pour l'Ecole d'Orthoptie***

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

##### ***Pour l'Ethique Médicale***

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
-----	------------------	-----------------------

**A Monsieur le Professeur Christian Binet**

Je vous remercie d'avoir accepté de présider cette thèse et de juger ce travail.

Je vous remercie de m'avoir guidé durant mon internat vers la spécialisation en Hématologie et pour toute la passion que vous mettez à l'enseigner.

**A Monsieur le Professeur Jorge Domenech**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de l'équipe de recherche.

**A Monsieur le Professeur Jean Christophe Pagès**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Je vous remercie de l'enseignement de qualité que vous m'avez apporté au cours de mon internat, notamment en Cancérologie Biologique.

**A Monsieur le Professeur Olivier Hérault**

Je vous remercie de m'avoir proposé ce travail et de l'avoir dirigé avec bienveillance.

Je vous remercie de me permettre de poursuivre mon cursus en Hématologie Biologique au sein de votre équipe, avec qui je me fais une joie de bientôt travailler.

**Je tiens à remercier également :**

Le Docteur Sébastien Lachot de m'avoir transmis ta passion pour l'Hématologie Biologique, de m'avoir offert ton amitié et ta gentillesse.

L'équipe du Service d'Hématologie Biologique de l'hôpital Bretonneau, et plus particulièrement Emmanuel Renoult, Julien Houssier et Emilie Degroote (*ROS team*), pour leur aide et leurs conseils précieux en Biologie Moléculaire.

L'équipe du Laboratoire de Recherche Equipe UPRES EA3855 « Microenvironnement de l'hématopoïèse et cellules souches » pour votre accueil chaleureux et le temps que vous m'avez consacré.

L'équipe du Laboratoire d'Hématologie Biologique du CHR d'Orléans notamment Dr Eric Legac et Dr Sophie Icquel pour votre patience et votre soutien lors de la rédaction de ce travail.

*A mes parents et ma sœur qui sont à l'origine de ce que je suis aujourd'hui.*

*A ma femme, Chloé, je te remercie pour ta patience et pour tout l'amour que tu m'apportes.*

*A ma fille, Clémentine, mon bijou, mon soleil.*

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
<b>GENERALITES</b> .....	<b>6</b>
A. L'Hématopoïèse normale .....	6
1. Localisation de l'hématopoïèse .....	6
2. Les compartiments de l'hématopoïèse .....	6
3. Le microenvironnement .....	8
B. Généralités sur le métabolisme oxydatif .....	12
1. Origine des espèces réactives de l'oxygène .....	12
2. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs effets.....	14
3. Système antioxydant .....	15
C. Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes .....	17
D. Le métabolisme oxydatif au cours de l'hématopoïèse et des LAM .....	18
1. Le métabolisme oxydatif au cours de l'hématopoïèse physiologique .....	18
2. Le métabolisme oxydatif dans les LAM .....	19
<b>REVUE DE LA LITTERATURE : LA VOIE NRF2/KEAP1</b> .....	<b>21</b>
A. Données sur la voie NRF2/KEAP1 .....	21
1. Structure de NRF2 .....	21
2. Structure de KEAP1 .....	23
3. Interaction NRF2/KEAP1 .....	24
4. NRF2 et <i>Antioxidative Responsive Element</i> .....	24
5. Gènes cibles de NRF2 .....	26
B. NRF2 et cancer .....	26
1. NRF2 et prévention du cancer .....	26
2. NRF2 et promotion du cancer .....	28
3. NRF2 et résistance .....	31
C. NRF2 en hématologie .....	32
1. NRF2 au cours de l'hématopoïèse .....	32

2. NRF2 en onco-hématologie .....	33
<b>STRATEGIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>36</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>37</b>
A. Cellules .....	37
B. Cellularite, viabilité et cytologie .....	37
C. Niveau de peroxyde d'hydrogène par cytométrie en flux .....	38
D. Etude protéique.....	40
1. Extraction protéique cytoplasmique et nucléaire .....	40
2. Dosage des extraits protéiques .....	40
3. Western blot.....	40
E. Etude en microscopie confocale .....	42
F. Etude du niveau d'expression des gènes .....	43
1. Extraction des acides ribonucléiques (ARN) totaux .....	43
2. Quantification et contrôle de la qualité des ARN.....	43
3. Retro-transcription des ARN.....	43
4. Contrôle de la retro-transcription par PCR.....	44
5. PCR quantitative en temps réel .....	44
<b>RESULTATS.....</b>	<b>46</b>
A. Cytologie .....	46
B. Cellularité .....	46
C. Evaluation du niveau de peroxyde d'hydrogène par cytométrie en flux.....	46
D. Localisation intra-cellulaire de NRF2 .....	50
E. Localisation de NRF2 en microscopie confocale .....	50
F. Expression des gènes cibles de NRF2 .....	54
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>60</b>

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Schéma général de l'hématopoïèse.

Figure 2 : Principales réactions impliquées dans le métabolisme oxydatif.

Figure 3 : Profil d'expression des gènes cibles de NRF2 dans les cellules KG1a après contact avec des CSM

Figure 4 : Structures de NRF2 et KEAP1

Figure 5 : Interaction NRF2/KEAP1 et activation de NRF2.

Figure 6 : Principe du marquage par le DCFDA.

Figure 7 : Aspect cytologique des cellules KG1a et THP1.

Figure 8 : Evolution de la cellularité des cellules KG1a et THP1 non traitées et traitées par la NAC ou la BSO.

Figure 9 : Fluorescence des cellules KG1a et THP1 marquées au H<sub>2</sub>-DCF-DA.

Figure 10 : Variation de NRF2 dans les extraits nucléaires des cellules THP1 en fonction de l'état oxydatif.

Figure 11 : Localisation subcellulaire de NRF2 dans les cellules KG1a.

Figure 12 : Localisation subcellulaire de NRF2 dans les cellules THP1.

Figure 13 : Effet de la NAC et de la BSO sur l'expression de différents gènes du métabolisme oxydatif dans les cellules KG1a.

Figure 14 : Effet de la NAC et de la BSO sur l'expression de différents gènes du métabolisme oxydatif dans les cellules THP1.

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ARE :	<i>Antioxydant responsive element</i>
BCA :	<i>Bicinchoninic acid</i>
BET :	Bromure d'éthidium
BSA :	<i>Bovin serum albumin</i>
BSO :	Buthionine sulfoximine
CAT :	Catalase
CSH :	Cellules souches hématopoïétiques
CSL :	Cellules souches leucémiques
CSM :	Cellules souches mésenchymateuses
Ct :	<i>Cycle threshold</i>
DEPC :	Diéthylpyrocarbonate
dNTPs :	Désoxynucléotidetriphosphates
DO :	Densité optique
FAB :	<i>French-American-British</i>
FTH1 :	<i>Ferritin Heavy 1</i>
GAPDH :	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GCLM :	<i>Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit</i>
GCLC :	<i>Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit</i>
GPX :	Glutathion peroxydase
GSR :	Glutathion réductase
H2-DCF-DA :	Dichlorométhyl-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, acyl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydrogène
HMOX1 :	Hème oxygénase 1
HO· :	Radical hydroxyle
HRP :	<i>Horseradish peroxydase</i>
KCl :	Chlorure de potassium
KEAP1 :	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>

LAM :	Leucémie aigüe myéloïde
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEM :	<i>Modified eagle's alpha medium</i>
MeOH :	Methanol
NAC :	N-acetyl cystéine
NaCl :	Chlorure de sodium
NADPH :	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NRF2 :	<i>NFE2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2))related factor</i>
NQO1 :	NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> :	Anion superoxide
PBS :	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR :	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRDX :	<i>Peroxiredoxin</i>
PSM :	Poste de sécurité microbiologique
PVDF :	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
ROS :	<i>Reactive oxygen species</i>
RT :	<i>Reverse transcription</i>
SOD :	Super oxides dismutases
SVF :	Serum de veau fetal
Tris :	Trishydroxyméthylaminométhane
UPL :	<i>Universal Probe Library</i>

## INTRODUCTION

Le métabolisme oxydatif résulte de la balance entre les espèces réactives de l'oxygène (ou *Reactive Oxygen Species*, ROS) et le système antioxydant. Depuis quelques années, il constitue un axe de recherche majeur dans de nombreuses pathologies allant du diabète au cancer. En effet, outre les effets délétères du stress oxydatif, le niveau de ROS est impliqué dans la signalisation cellulaire, par exemple en inhibant des phosphatases. La régulation de l'état redox tend vers un équilibre propre à chaque type cellulaire en fonction de la physiologie et de l'environnement de la cellule.

Le système antioxydant se compose entre autre de nombreuses enzymes ayant une action directe ou indirecte sur les ROS. NRF2, un facteur de transcription sensible au niveau de ROS, a été identifié comme un acteur clé du métabolisme oxydatif. En effet, il participe à la régulation des ROS en activant l'expression de centaines de gènes dont un grand nombre codent pour des protéines du système antioxydant.

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des proliférations clonales malignes à partir de cellules immatures hématopoïétiques appartenant à la lignée myéloïde. Le taux de rechute est élevé dans ces pathologies notamment du fait de la persistance de cellules souches leucémiques (CSL). Une partie des recherches actuelles tente de comprendre l'ensemble des processus participant à la persistance des CSL. Les travaux récents de notre équipe ont montré une implication du métabolisme oxydatif dans ce phénomène. En effet, il existe une diminution du niveau des ROS dans les cellules leucémiques au contact de cellules souches mésenchymateuses (CSM), impliquant l'augmentation de GPx3, une enzyme du système antioxydant (Vignon, 2011). De plus, une étude transcriptomique a permis d'observer une diminution d'expression de nombreuses cibles de NRF2 dans ces cellules leucémiques au contact des CSM.

Le but de ce travail était de comprendre si NRF2, acteur central du système antioxydant, agit dans la régulation du statut redox des cellules leucémiques. Pour répondre à cette question nous avons utilisé comme modèle des lignées leucémiques exposées à des conditions pro-oxydante et antioxydante.

# **GENERALITES**

## **REVUE DE LA LITTERATURE : LA VOIE NRF2/KEAP1**

# GENERALITES

## A. L'Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est un processus physiologique ayant pour but la production continue et régulée des cellules du sang. Ces dernières ayant une durée de vie limitée (environ 7 jours pour les plaquettes, 120 jours pour les globules rouges et 24 heures pour les polynucléaires), ce sont  $10^{13}$  cellules qui sont produites chaque jour pour garder un nombre constant de cellules sanguines en situation physiologique. Ce renouvellement permanent est soumis à une régulation fine au sein de la niche hématopoïétique.

### 1. Localisation de l'hématopoïèse

Au stade embryonnaire, l'hématopoïèse « primitive » se déroule dans le sac vitellin puis dans la région AGM aorte-gonade-mésonephros. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) vont ensuite coloniser le foie fœtal, le thymus, la rate et enfin la moelle osseuse où elles s'installent de manière définitive. Celle-ci est localisée dans tous les os chez l'enfant puis, chez l'adulte, principalement dans les os plats et courts : le sternum, les os iliaques et les corps vertébraux (Cumano *et al.*, 2007).

### 2. Les compartiments de l'hématopoïèse

#### a) *Les cellules souches hématopoïétiques*

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules souches adultes multi-potentes. Elles ne représentent qu'un très faible pourcentage des cellules médullaires (0,01 à 0,05 %).

Elles se caractérisent par :

- l'auto-renouvellement, permettant un maintien du pool de CSH tout au long de la vie ;

- la multi-potence, leur conférant la possibilité de générer les différents types cellulaires hématopoïétiques ;
- la capacité de différenciation, permettant leur engagement vers une lignée hématopoïétique.

Ces cellules possèdent la capacité de reproduire une hématopoïèse lorsqu'elles sont greffées dans des souris immunodéprimées.

Le phénotype des CSH humaines est classiquement le suivant : CD34<sup>+</sup>Thy1<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup>.

### b) *Les progéniteurs*

Plus nombreux que les CSH, les progéniteurs restent cependant minoritaires et non identifiables sur un myélogramme (1 progéniteur pour 1000 cellules médullaires). Ces cellules perdent la capacité d'auto-renouvellement mais possèdent des capacités de prolifération importante. On distingue des progéniteurs immatures et les progéniteurs dits clonogéniques possédant la capacité à produire des colonies. Ils sont mis en évidence par des techniques de culture cellulaire en milieu semi-solide ou liquide en présence de facteurs de croissance. On classe alors les progéniteurs clonogéniques suivant le temps pour obtenir des colonies cellulaires, les types cellulaires qui composent les colonies, leur aspect et leur taille.

On distingue classiquement grâce aux techniques de culture cellulaire :

- les LTC-IC (*Long Term Culture Initiating Cells*),
- les CFU-GEMM (*Colony Forming unit – Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megacaryocyte*),
- les CFU-GM (*Colony forming unit – Granulocyte Monocytes*),
- les CFU-G et CFU-M,
- les BFU-E (*Burst Forming Unit – Erythrocyte*) et les CFU-E (*Colony Forming Unit – Erythrocyte*), les CFU-Meg (*Colony Forming Unit – Megacaryocyte*).

### *c) Les précurseurs*

Les précurseurs sont des cellules identifiables sur un myélogramme car ils présentent des caractères morphologiques spécifiques de lignée. Ils ne sont pas capables d'auto-renouvellement. Ce sont des cellules différenciées en cours de maturation. Ces cellules sont capables d'un nombre limité de mitoses et sont normalement localisées dans la moelle osseuse. On distingue :

- pour la lignée érythroïde : les proérythroblastes, les érythroblastes basophiles, les érythroblastes polychromatophiles et les érythroblastes acidophiles.
- pour la lignée mégacaryocytaire : les mégacaryoblastes, les mégacaryocytes basophiles, les mégacaryocytes granuleux et les mégacaryocytes matures.
- pour la lignée granuleuse : les myéloblastes, les promyélocytes, les myélocytes et les métamyélocytes.
- pour la lignée monocyttaire : les monoblastes et les promonocytes.

### *d) Les cellules et particules anucléées matures*

Les cellules matures du sang sont composées des polynucléaires granuleux (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), des lymphocytes et des monocytes. Les particules anucléées matures sont les réticulocytes, les hématies et les plaquettes. Une fois matures, ces éléments passent la barrière médullo-sanguine, composée essentiellement des cellules endothéliales des capillaires sanguins.

## 3. Le microenvironnement

On distingue classiquement, dans la moelle osseuse, deux zones où se déroule l'hématopoïèse :

- Une niche dite osteoblastique au contact des travées osseuses, où se trouvent les CSH et les progéniteurs les plus immatures,
- Une niche dite vasculaire, au contact des vaisseaux sanguins, où se situent les cellules plus matures.

Le terme « microenvironnement » désigne l'ensemble des acteurs qui forment la niche hématopoïétique, favorisant les propriétés des cellules souches hématopoïétiques et l'hématopoïèse dans son ensemble. Il se compose de la matrice extra-cellulaire (MEC), les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou cellules stromales, les chimiokines, les travées osseuses et l'innervation autonome.

#### *a) La matrice extra-cellulaire*

La matrice extra-cellulaire est composée d'un ensemble de protéines formant une structure de soutien des cellules et favorise leur adhésion.

Les trois types moléculaires formant la MEC sont les suivants :

- les protéoglycanes tels que l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le kératane sulfate, l'héparane sulfate,
- les glycoprotéines telles que la fibronectine et la laminine principalement,
- les collagènes de type 1 et 3 créant un réseau entre les travées osseuses et les capillaires sanguins.

Cette matrice a pour fonctions biologiques, outre l'adhésion des cellules, la fixation et la présentation de diverses cytokines et la régulation de la croissance cellulaire.

#### *b) Les cellules souches mésenchymateuses*

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules souches adultes multipotentes. Elles se trouvent principalement dans la moelle osseuse et dans le tissu adipeux. Elles possèdent le phénotype suivant : CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34-, CD14-, CD79 $\alpha$ - et HLA-DR-. Du fait de leur degré de plasticité important, elles sont à l'origine de plusieurs types tissulaires tels que les tissus musculaires, les tissus adipeux, le cartilage et l'os.

Hormis ces capacités de différenciation, les CSM jouent un rôle important dans le support de l'hématopoïèse en sécrétant les cytokines nécessaires à celle-ci.

*c) Les chimiokines*

Les agents chemo-attractants ou chimiokines sont des petites protéines jouant un rôle dans la localisation et la domiciliation des CSH au contact du micro-environnement. Par exemple, le CXCL12 (ou SDF1, *Stroma cell-Derived Factor-1*) est sécrété par les cellules stromales. Il favorise par son interaction avec les récepteurs CXCR4 et CXCR7, présents à la surface des CSH, leur attraction et leur domiciliation dans la niche hématopoïétique.

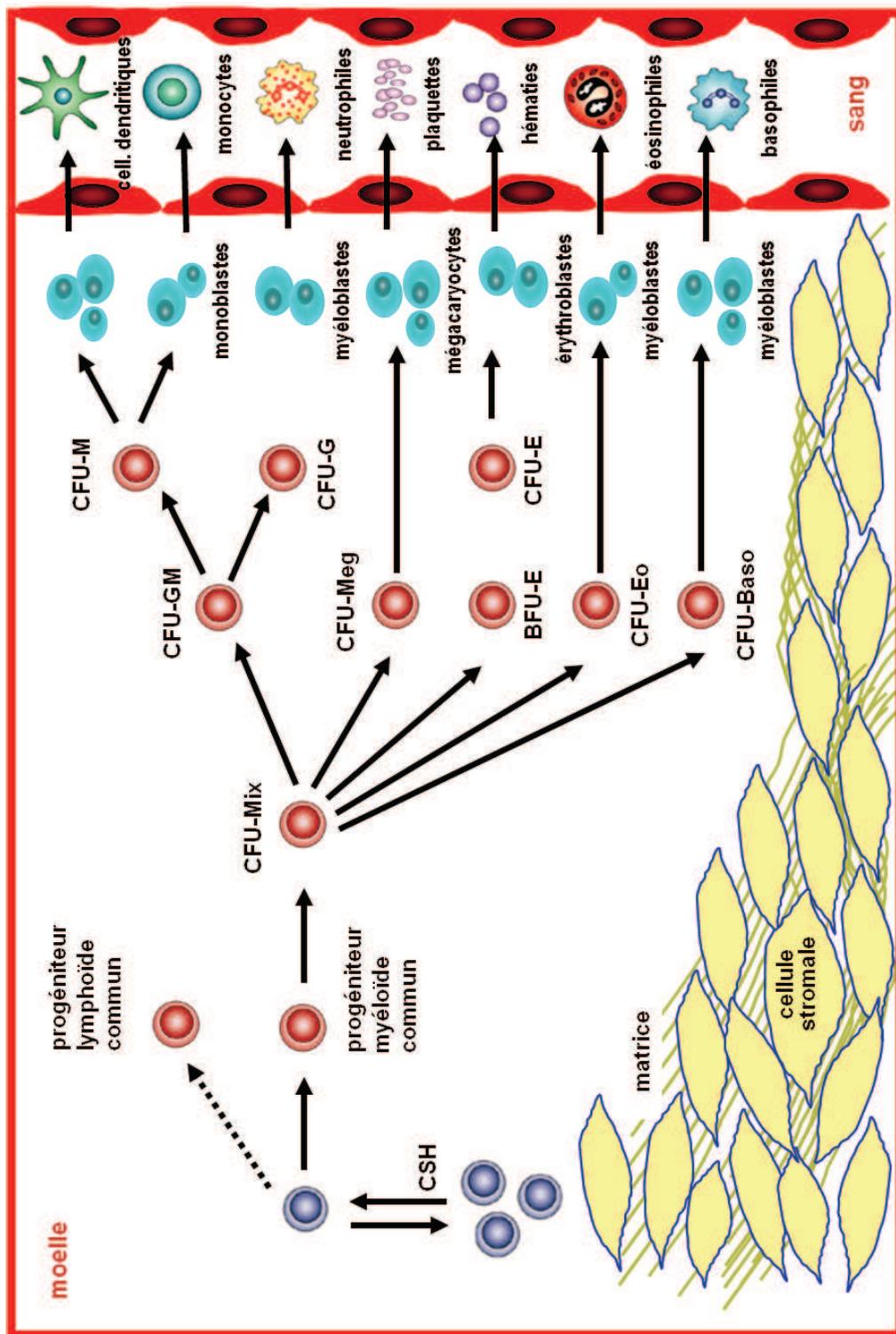
*d) Les travées osseuses*

Les travées osseuses contiennent au niveau de l'endoste les cellules responsables de la synthèse osseuse, les ostéoblastes. Ces derniers participent à la régulation de l'hématopoïèse en sécrétant des facteurs favorisant la quiescence et le maintien des CSH (SDF1, osteopontine, angiopoietine 1...).

*e) Le système nerveux sympathique*

L'innervation de la moelle osseuse par le système nerveux autonome sympathique joue un rôle dans l'hématopoïèse en modulant l'activation des cellules du microenvironnement (ostéoblastes et CSM) et notamment leur sécrétion de chimiokines et cytokines.

L'hématopoïèse est représentée sur la figure 1.



**Figure 1 : Schéma général de l'hématopoïèse.**

D'après le site de la Faculté de médecine de Tours

<http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DC1/DC1.html>

## B. Généralités sur le métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif résulte de la balance entre la production de ROS et le système antioxydant de la cellule (Figure 2). Le stress oxydant, du à un excès de ROS, est responsable de dégâts sur la cellule pouvant provoquer *in fine* l'apoptose.

### 1. Origine des espèces réactives de l'oxygène

#### a) *La respiration mitochondriale*

La principale source d'espèces radicalaires de l'oxygène réside dans la respiration mitochondriale. En effet, l'oxygène est indispensable à la production d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) dans la cellule. Cette production d'énergie, appelée phosphorylation oxydative se fait *via* les chaînes de transports d'électrons au sein de la membrane interne mitochondriale. La réduction tétravalente de l'oxygène en eau se fait en plusieurs étapes successives donnant naissance à des intermédiaires potentiellement réduits appelés ROS. On estime que 2 à 5% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en radicaux superoxydes  $O_2^{\cdot -}$  de manière continue et physiologique.

#### b) *La NAD(P)H oxydase membranaire*

En plus de la production de ROS par la respiration mitochondriale, il existe un autre système majeur capable de produire des radicaux superoxydes  $O_2^{\cdot -}$  : la NAD(P)H oxydase membranaire (NOX). La NOX est une enzyme qui catalyse la réduction de l' $O_2$  en utilisant comme donneur d'électron le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH dans sa forme réduite ou NADP dans sa forme oxydée). Cette enzyme est importante dans les cellules phagocytaires pour assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes. Elle existe également dans les autres cellules non phagocytaires et participe à la signalisation cellulaire. Elle est localisée à la membrane cytoplasmique et dans certains granules des polynucléaires neutrophiles.

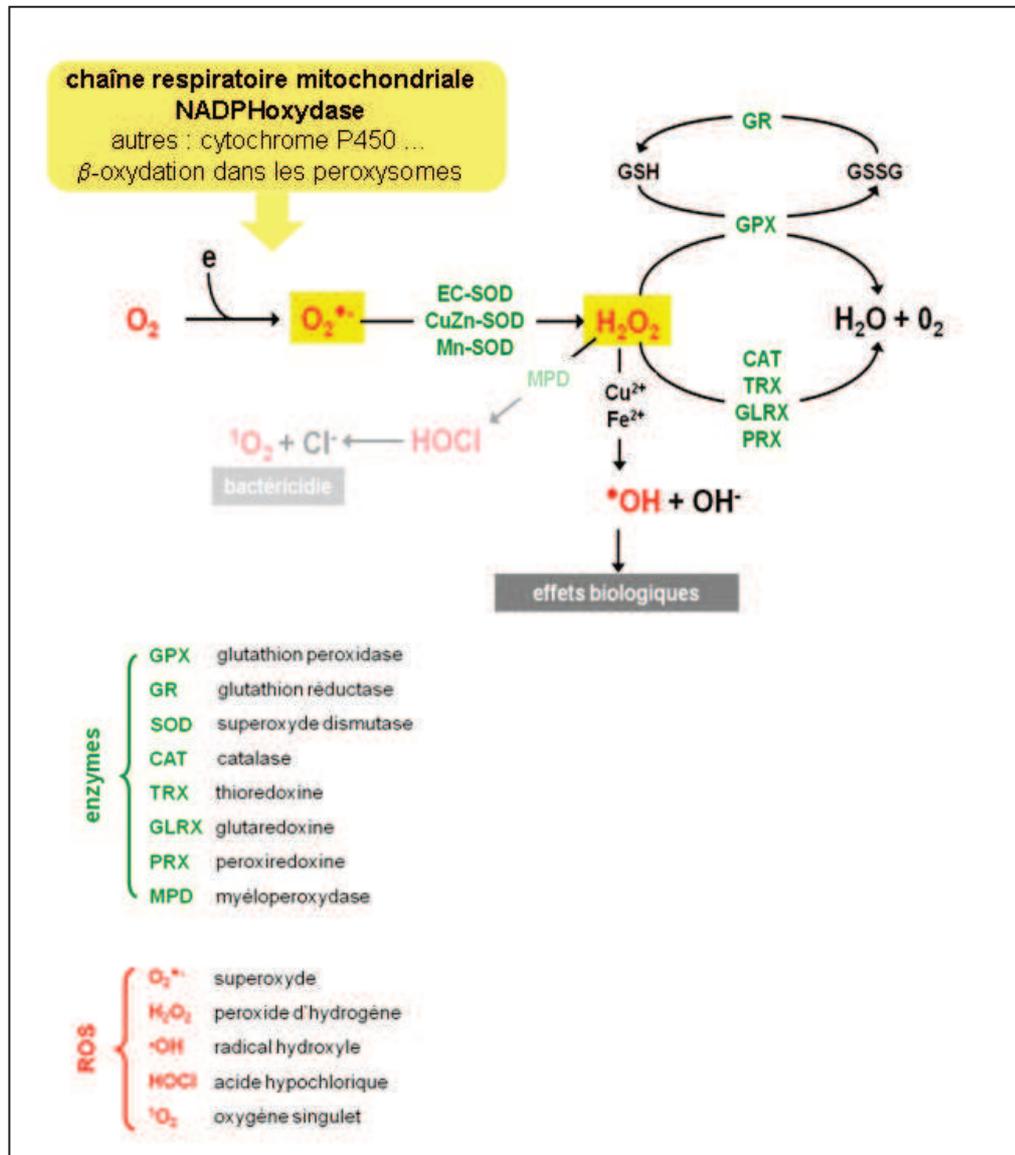


Figure 2 : Principales réactions impliquées dans le métabolisme oxydatif.

### c) *Autres sources de ROS*

D'autres sources de ROS ont été identifiées dans la cellule. Nous pouvons citer la xanthine oxydase, la famille du cytochrome p450, les enzymes de la voie de l'acide arachidonique, les enzymes des peroxysomes et des lysosomes. Toutes ces enzymes sont responsables de la production d' $O_2^{\cdot-}$ .

## 2. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs effets

### a) *L'anion superoxyde*

La première réduction du dioxygène donne l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Cet anion est instable et non diffusible. Il est le moins réactif des ROS avec les substrats bio-organiques et possède une toxicité indirecte. En effet, il existe quatre voies de transformation du radical superoxyde donnant d'autres ROS :

- la dismutation spontanée correspondant à une deuxième réduction donnant le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ),
- la dismutation catalysée par la superoxyde dismutase (SOD),
- la réaction d'Haber-Weiss, catalysée par l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  consistant en la réduction d' $H_2O_2$  donnant le radical hydroxyle  $\cdot OH$ ,
- *via* la réaction d' $O_2^{\cdot-}$  avec le monoxyde d'azote radicalaire  $\cdot NO$  donnant le peroxyde d'azote  $OONO^{\cdot}$  ayant des effets délétères sur l'ADN, les protéines et les lipides.

### b) *Le radical hydroxyle*

Le radical hydroxyle  $\cdot OH$  est l'espèce la plus réactive en biologie mais est non diffusible. Il peut réagir avec la plupart des composants cellulaires : lipides, protéines et ADN.  $\cdot OH$  peut oxyder ses substrats selon trois modes d'action : arrachement d'un électron, arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique ou addition sur une double liaison.

### c) *Le peroxyde d'hydrogène*

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est un élément capital dans le métabolisme oxydatif. En effet cette molécule est stable et diffusible. Les principales sources de ROS induisent la formation de  $H_2O_2$  qui va avoir deux fonctions dans la cellule :

- d'une part, il va être transformé *via* la réaction de Fenton par oxydation de  $Fe^{2+}$  donnant du  $Fe^{3+}$  et le radical hydroxyle  $\cdot OH$ ,
- d'autre part, le peroxyde d'hydrogène sert de second messager notamment en inhibant des protéines tyrosines phosphatases (PTP) dans la cellule à l'origine des signaux cellulaires lors d'un changement de l'état redox de la cellule.

### 3. Système antioxydant

Les cellules possèdent un système antioxydant pour assurer l'élimination des ROS et respecter l'état redox intra-cellulaire. Ce système fonctionne selon trois axes :

- empêcher les espèces chimiques de réagir ensemble,
- transformer les oxydants en espèces moins toxiques,
- prévenir ou réparer les lésions oxydatives induites.

Il se compose d'enzymes, ayant une action directe ou indirecte sur les ROS, et d'agents piègeurs ou « *scavengers* ».

### a) *Les enzymes*

**Les superoxyde dismutases (SOD)** sont des metallo-enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Il en existe trois chez les humains :

- La SOD1 (CuZn-SOD) nécessite des ions cuivre et zinc pour fonctionner. Elle est présente dans le cytoplasme des cellules.
- La SOD2 (Mn-SOD) nécessite du manganèse pour fonctionner. Elle est localisée dans les mitochondries.
- La SOD3 est localisée à la membrane cellulaire et en extra-cellulaire. Elle nécessite également des ions cuivre et zinc pour fonctionner.

**La catalase (CAT)** est une enzyme catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en dioxygène  $O_2$  et en eau  $H_2O$ . Elle contient des molécules d'hème participant à la réaction grâce aux ions ferriques qu'elles contiennent. Elle est fortement exprimée dans le foie et les érythrocytes.

**Les glutathion peroxydases (GPX)** sont des enzymes contenant des sélénocystéines. Il existe cinq types différents de GPX suivant la localisation de leurs expressions. On les retrouve dans les liquides extra-cellulaires mais aussi dans le cytosol et les mitochondries. Elles catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en utilisant le glutathion (GSH) comme cofacteur pour donner de l'eau et le disulfure de glutathion (GSSG), la forme oxydée du glutathion.

**Les hèmes oxygénases (HMOX)** sont des enzymes responsables de la dégradation intra-cellulaire de l'hème en biliverdine qui sera dégradée en bilirubine. Cette dernière étant un puissant antioxydant, l'hème oxygénase est indirectement une enzyme antioxydante. Seule l'hème oxygénase 1 (*HMOX1*) est inductible par divers stimuli (hyperoxie, taux élevé d'hème, peroxyde d'hydrogène, monoxyde d'azote...). Celle-ci est présente dans de nombreux types cellulaires car elle joue un rôle de cofacteur avec des protéines impliquées dans des fonctions biologiques fondamentales. *HMOX1* possède une séquence de type *Antioxydative responsive element* (ARE) sur laquelle NRF2 va se fixer pour induire sa transcription

D'autres enzymes antioxydantes participent à la régulation du stress oxydatif comme la Glutathion Réductase (GR), transformant le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) ; la Peroxiredoxine 1 (PRDX1), la Glutaredoxine (GLRX) et la Thioredoxine (TXN), responsables de la réduction du peroxyde d'hydrogène.

Des enzymes prennent part de manière indirecte à la diminution des ROS telles que la Glutamate cystéine ligase (GCLM sous-unité régulatrice et GCLC sous-unité catalytique), enzyme rentrant dans la voie de synthèse du glutathion et la NAD(P)H déshydrogénase (quinone) 1 (NQO1), une enzyme de détoxification cellulaire de phase II (la phase I correspondant à la phase d'inactivation des toxiques et la phase II à leur

transformation pour élimination). Les gènes de ces enzymes possèdent chacun un ARE auxquels peut se fixer NRF2 induisant leur transcription.

b) *Les agents piègeurs ou « scavengers »*

**L'alpha tocopherol** (ou vitamine E) et **la vitamine C** sont de puissants antioxydants car ils inhibent la peroxydation lipidique en réagissant avec l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle.

**Le glutathion** est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le glutathion SH (réduit) ou S-S (oxydé) forme un couple d'oxydoréduction très important car, d'une part, il est le cofacteur des GPX et d'autre part, il est capable de fixer certains métaux lourds comme le cadmium, le mercure et le plomb qui sont connus pour être toxiques et pourvoyeurs de ROS.

**Les oligo-éléments** tels que le sélénium, le cuivre et le zinc sont nécessaires pour le fonctionnement des principales enzymes antioxydantes.

### **C. Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes**

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des proliférations clonales malignes à partir de cellules immatures hématopoïétiques appartenant à la lignée myéloïde. Ces cellules, appelées blastes, perdent la capacité de se différencier normalement et de répondre aux signaux de régulation de la prolifération cellulaire. L'expansion clonale débute dans la moelle osseuse puis envahit l'organisme (Estey *et al.*, 2006).

Les LAM constituent un groupe hétérogène d'hémopathies. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé 2008 (OMS 2008) des LAM repose en partie sur les anomalies du caryotype. La classification FAB (*French-American-British*), plus ancienne, classe les LAM selon leur morphologie.

Le taux de rechute est élevé dans ces pathologies du fait de la persistance de cellules souches leucémiques (CSL) partageant avec les CSH normales des caractéristiques de différenciation, d'auto-renouvellement et de quiescence leur procurant la capacité à reproduire à elles seules la maladie (Lapidot *et al.*, 1994).

Le traitement des LAM repose principalement sur des chimiothérapies cytotoxiques. Leur action est principalement focalisée sur les cellules en mitose. Les CSL, quiescentes, échappent au traitement et sont principalement responsables des rechutes. De ce fait, la survie à cinq ans varie de 15 à 70% dépendant de facteurs cliniques et biologiques ; et la survie toutes LAM confondue ne dépasse pas 20% (Estey *et al.*, 2006). De plus, environ 75% des patients étant diagnostiqué après l'âge de 60 ans, les stratégies thérapeutiques intensives sont généralement limitées à une minorité de jeunes patients.

#### **D. Le métabolisme oxydatif au cours de l'hématopoïèse et des LAM**

##### **1. Le métabolisme oxydatif au cours de l'hématopoïèse physiologique**

Des études de l'hématopoïèse murine et chez la drosophile ont montré qu'il existe une différence de niveau de ROS entre les CSH qui ont un niveau de ROS bas et les cellules matures qui ont un niveau plus élevé. Ce gradient pourrait être corrélé au gradient de pression en oxygène existant entre la niche ostéoblastique, où sont localisées les cellules souches, et la niche vasculaire, où sont localisées les cellules matures (Jang *et al.*, 2007)

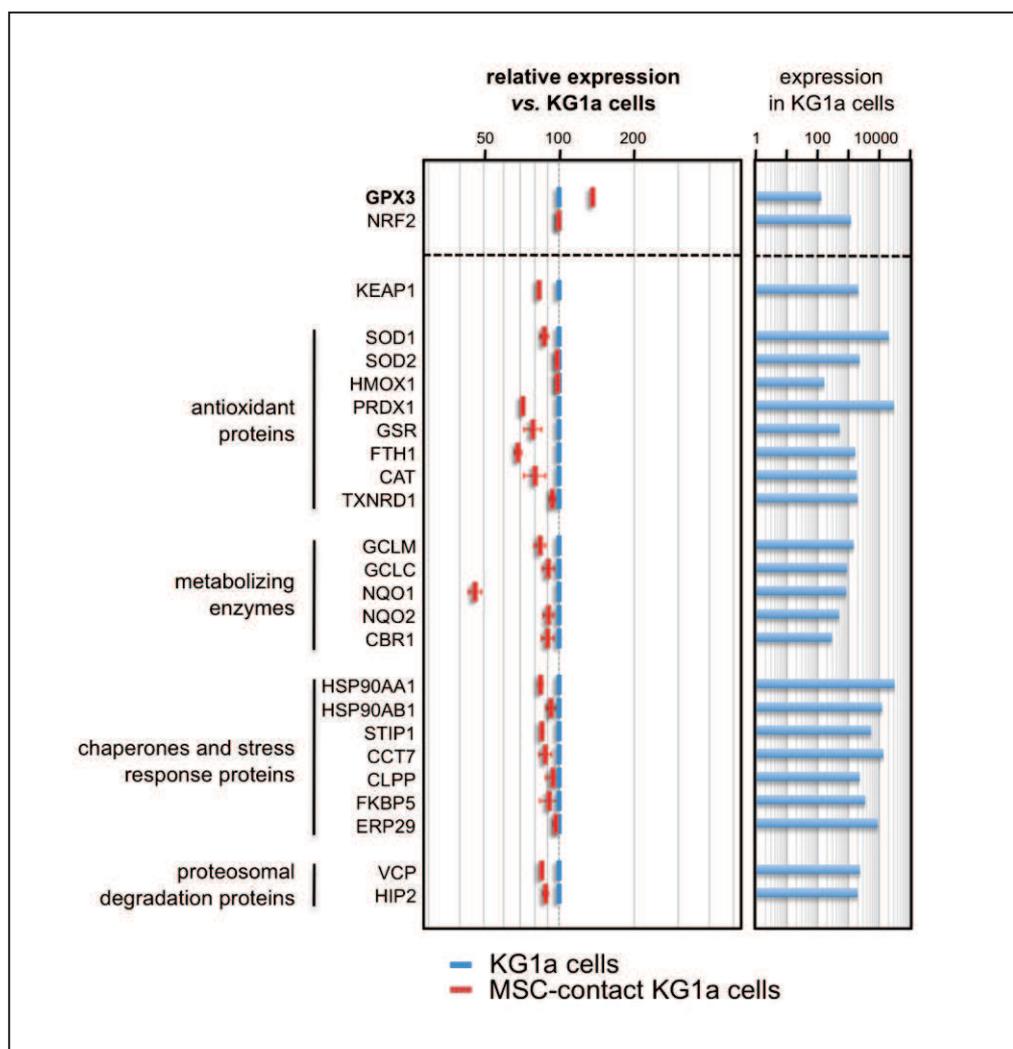
Hao *et al* ont montré que les CSH humaines ont un niveau de ROS, un degré de prolifération, une capacité de différenciation et de migration corrélés avec la concentration en oxygène (Hao *et al.*, 2011).

Ainsi, il a été établi chez la souris qu'un faible niveau de peroxyde d'hydrogène dans les CSH leur procure la capacité d'auto-renouvellement par inactivation de p38 MAPK (Ito *et al.*, 2006). Chez la drosophile, une augmentation transitoire des ROS serait nécessaire à la différenciation myéloïde (Owusu-Ansah *et al.*, 2009).

## 2. Le métabolisme oxydatif dans les LAM

Il a été démontré que les CSL murines comme les cellules souches hématopoïétiques normales surexprimeraient une enzyme antioxydante : la *Glutathion peroxydase 3 (GPX3)*, indispensable à leur auto-renouvellement (Herault *et al.*, 2010). Dans un modèle *in vitro* mettant en contact des cellules leucémiques (KG1a) et des CSM, il a été observé dans les cellules leucémiques, une diminution du niveau d' $H_2O_2$ , une augmentation de l'expression du gène de la *GPX3* ainsi qu'une inhibition de p38 MAPK suggérant un rôle des CSM dans la régulation du métabolisme oxydatif des cellules leucémiques (Vignon *et al.*, 2010).

Récemment, la même équipe a analysé le transcriptome de ces cellules leucémiques après trois jours au contact de CSM et a retrouvé une diminution de nombreux gènes cibles de NRF2 (*SOD1, PRDX1, FTH1, CAT, GCLM, GCLC, NQO1...*) (données non publiées, Figure 3).



**Figure 3 : Profil d'expression des gènes cibles de NRF2 dans les cellules KG1a après contact avec des CSM.**

Transcriptome de cellules leucémiques KG1a après 3 jours de contact avec des CSM par rapport à KG1a sans contact. Expression en unité relative. *Illumina BeadChips Human HT12 v3 Plateforme STE, CHU Angers* (d'après Hérault *et al.*, données non publiées).

# REVUE DE LA LITTÉRATURE : LA VOIE NRF2/KEAP1

## A. Données sur la voie NRF2/KEAP1

En 1994, Moi *et al* ont découvert NRF2 (ou *Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2*) en recherchant des séquences polypeptidiques présentant une affinité avec la séquence NFE2/AP1 située dans le promoteur du gène de la  $\beta$ -globine (Moi *et al.*, 1994). Comme NFE2, NRF2 est aussi un membre de la sous-famille des facteurs de transcription *cap'n'collar* de type *zipper* à leucines basiques. Son expression est ubiquitaire.

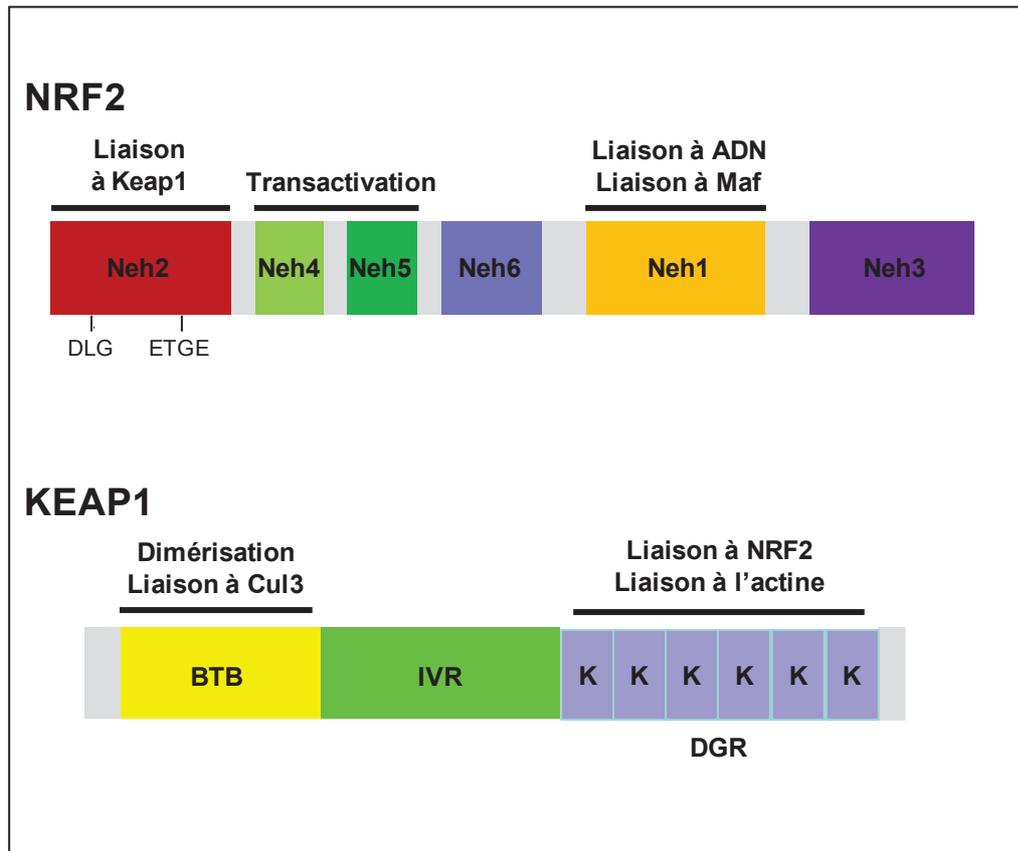
KEAP1 (ou *Kelch-like ECH-associated protein 1*) a été découvert en 1999 par Itoh *et al* en recherchant la cause de la régulation négative de NRF2 (Itoh *et al.*, 1999). La confirmation *in vivo* de son rôle d'inhibiteur de NRF2 a été démontrée chez des souris KO pour *Keap1* (Wakabayashi *et al.*, 2003). C'est une protéine cytoplasmique liée à des fibres d'actine (Kang *et al.*, 2004). Une de ses fonctions connues est de séquestrer NRF2 dans le cytoplasme.

### 1. Structure de NRF2

NRF2 est une protéine de 605 acides aminés composée de six domaines, Neh1 à Neh6 (NRF2-ECH *homology*) (Figure 4), codée par le gène *NFE2L2* (l'alias *NRF2* sera utilisé dans le texte par souci de compréhension).

Le domaine Neh1 comporte une structure de type *zipper* à leucines basiques nécessaire à la dimérisation avec les petites protéines MAF et à la fixation à l'ADN. Une séquence de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localisation Sequence*) a de plus, été retrouvée dans ce domaine (Jain, 2005).

Neh2 est un domaine hautement conservé entre les espèces et contient deux sites de liaison avec les domaines Kelch de KEAP1 au niveau des motifs DLG (situé entre les acides aminés 27 à 32) et ETGE (situé entre les acides aminés 77 à 82). Il contient, de plus, sept résidus lysines, lieux de liaison aux ubiquitines, conduisant à la dégradation de NRF2 par le protéasome (Kobayashi *et al.*, 2004) (Zhang *et al.*, 2004).



**Figure 4 : Structures de NRF2 et KEAP1.**

NRF2 est composé de 6 domaines. Neh2, le site de liaison à KEAP1, contient les motifs DLG et ETGE. Neh 4 et Neh5 sont le lieu de fixation d'un co-activateur de la transcription, CBP. Neh1 contient le domaine basique riche en leucine responsable de la liaison à l'ADN et de l'hétérodimerisation avec les petites protéines MAF. KEAP1 est composé de 3 domaines. Le domaine BTB (*Broad complex, Tramtrack, Bric-a-Brac*) est responsable de la fixation du complexe d'ubiquitination Cul3-Rbx1. Le domaine IVR (*Intervening region*) contient des cystéines pouvant réagir avec les ROS et changer la conformation de la protéine. Le domaine DGR (*Double Glycine Repeat*) contient 6 motifs Kelch et est responsable de la liaison à NRF2 et à l'actine.

Neh 3 est nécessaire à l'activation transcriptionnelle en recrutant un co-activateur, CHD6 (*chromodomain helicase DNA binding protein 6*), une protéine liant l'ADN de type hélicase, faisant parti du complexe transcriptionnel (Nioi *et al.*, 2005).

Neh 4 et 5, riches en résidus acides, sont les sites de trans-activation qui se lient à la CREB-binding protein (CBP, CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) Binding Protein) (Katoh *et al.*, 2001).

Le domaine Neh6, est riche en résidus serines et son rôle est inconnu.

## 2. Structure de KEAP1

KEAP1 est une protéine de 624 acides aminés contenant trois domaines (Figure 4). Le domaine BTB (*Broad-complex, Tramtrack and Bric a brac*) est principalement le site de fixation du complexe d'ubiquitination (Cullin3 et RBX1). Ce domaine est aussi la région servant à la dimérisation de KEAP1. Le domaine IVR (*Intervening Region*) est riche en cystéines ayant un rôle dans la conformation tertiaire et donc dans la fonction de la protéine. Et enfin, un domaine DGR (*Double Glycine Repeat*) composé de 6 motifs Kelch, répétition de deux glycines, par lequel il y a liaison à NRF2.

KEAP1 étant riche en résidus cystéines, il est un véritable senseur de l'état redox des cellules. En effet, les résidus cystéines réagissent avec les ROS ou des molécules dites inductrices de NRF2 présentes dans la cellule. Cette modification des résidus cystéines empêche la liaison à NRF2 ou une impossibilité de recruter le complexe d'ubiquitination associé à KEAP1 stabilisant les protéines NRF2 libres et permettant leur migration vers le noyau. Les cystéines les plus importantes seraient les suivantes :

- la cystéine 151 située dans le domaine BTB serait importante pour le recrutement du complexe d'ubiquitination et la dimérisation de KEAP1,
- les cystéines 273 et 288 dans le domaine IVR seraient nécessaires à une conformation tertiaire optimale pour fixer NRF2 (Zhang *et al.*, 2003).

### 3. Interaction NRF2/KEAP1

Dans un état d'équilibre, NRF2 est lié à KEAP1 dans le cytoplasme. Lorsqu'il y a augmentation de la quantité de ROS dans la cellule, ceux-ci vont réagir avec les résidus cystéines de KEAP1 avec comme conséquences, d'une part, le non recrutement du complexe d'ubiquitination et donc l'absence de dégradation de NRF2, et d'autre part, l'absence de fixation à NRF2. Ces deux phénomènes favorisent une augmentation et une stabilisation de NRF2 dans le cytoplasme puis une migration de celui-ci vers le noyau (Figure 5).

En cas d'augmentation des ROS et après la translocation nucléaire de NRF2, KEAP1 régule négativement l'expression des gènes NRF2-dépendants en migrant dans le noyau et en se fixant à NRF2 pour stopper le signal de transcription provoqué par la liaison NRF2/ARE. Le complexe NRF2/KEAP1 serait alors exporté du noyau grâce à une séquence d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Sequence*) dans KEAP1 (Sun *et al.*, 2007).

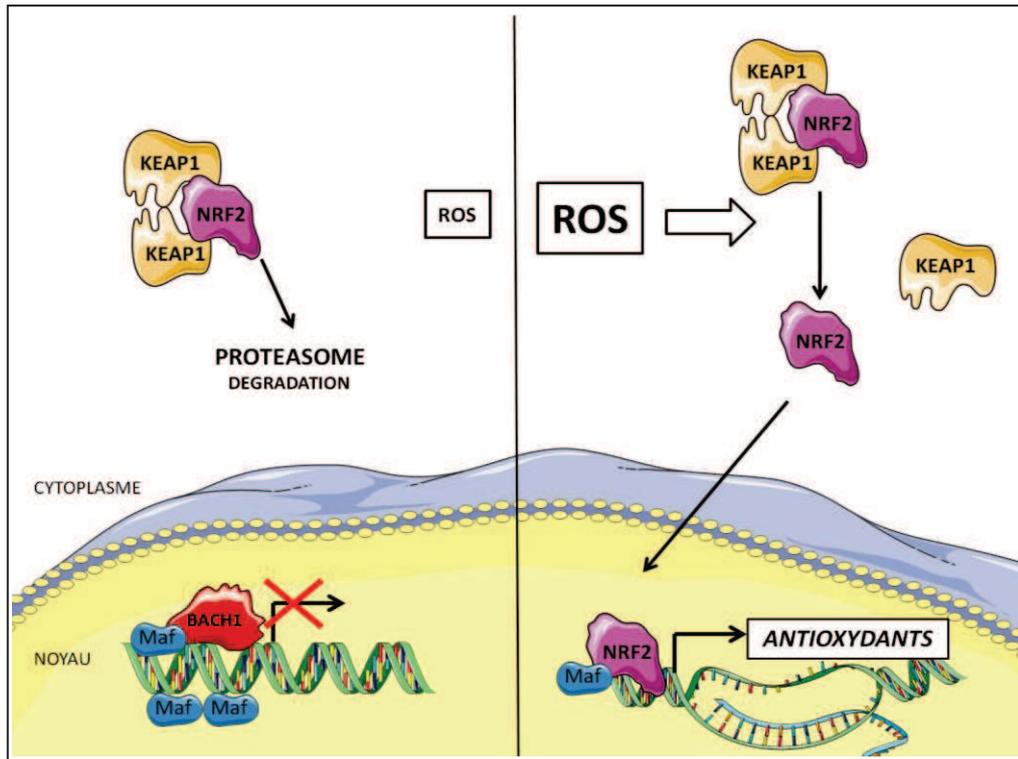
### 4. NRF2 et *Antioxidative Responsive Element*

Les *Antioxidative Responsive Elements* (ARE) sont des séquences spécifiques (5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3', les bases majeures étant en majuscules) situées généralement en amont de la séquence codante des gènes, dans la région régulatrice (Rushmore *et al.*, 1991) (Nioi *et al.*, 2003).

Cette séquence sera le lieu de fixation d'un hétéro-dimère de NRF2 avec une protéine MAF, de la famille des bZIP. L'hétéro-dimère MAF/NRF2 se fixera sur une séquence spécifique de type ARE engendrant la transcription du gène cible auquel il appartient (Itoh *et al.*, 1997).

Les ARE peuvent aussi fixer des homo-dimères de MAF, ce qui a pour conséquence d'inhiber la transcription du gène. D'autres protéines ont la possibilité de former des hétéro-dimères avec MAF et de se fixer aux ARE. C'est le cas de BACH1.

Les hétéro-dimères BACH1/MAF se fixent sur les ARE, inhibant ainsi la transcription du gène cible. Lors d'une augmentation du niveau de ROS intra-cellulaire, il a été montré que BACH1 se détache des ARE et est exporté dans le cytoplasme, permettant l'accessibilité de l'ARE pour NRF2 (Sun *et al.*, 2002).



**Figure 5 : Interaction NRF2/KEAP1 et activation de NRF2.**

Lorsque le niveau de ROS est bas, il y a séquestration de NRF2 par KEAP1 dans le cytoplasme. KEAP1 va recruter le système d'ubiquitination Cul3-Rbx1 menant à la dégradation de NRF2 par le protéasome. Des homodimères de MAF ou des hétérodimères MAF/BACH1 agissent comme des inhibiteurs transcriptionnels en se fixant sur les ARE. En présence de ROS, il y a libération de NRF2 par KEAP1. NRF2 va alors migrer vers le noyau pour aller se fixer aux *Antioxydant Responsive Element* (ARE), associé à une protéine MAF. Ceci va entraîner la transcription des gènes cibles.

## 5. Gènes cibles de NRF2

Les gènes cibles de NRF2 sont nombreux et peuvent être groupés en quatre catégories principales :

- **Les enzymes de la balance redox intra-cellulaire** ont pour but de maintenir le niveau intra-cellulaire de glutathion et de réduire le niveau de ROS : la Glutamate Cystéine Ligase (*GCL*), la Glutathion Peroxydase (*GPX*), la Thioredoxine (*TRX*), la Thioredoxine Reductase (*TR*), la Peroxiredoxine (*PRX*), la Heme Oxygenase-1 (*HMOX1*) ...
- **Les enzymes de détoxification de phase 2** catalysent les réactions de conjugaison pour augmenter la solubilité et donc l'élimination des toxiques : la Glutathion S-Transferase (*GST*), la NAD(P)H Quinone Oxidoreductase-1 (*NQO1*), la UDP-Glucuronosyl Transferase (*UGT*) ...
- **Les transporteurs** contrôlent l'efflux des substances intra-cellulaires et des xenobiotiques : la *Multidrug Resistance-associated Protein (MRP)*.
- **Les facteurs de transcription** comme *MAFF*, *MAFG* et *NRF2* lui-même sont contrôlés par NRF2.

## B. NRF2 et cancer

De part son rôle central dans le contrôle de l'état redox des cellules, il a été montré que NRF2, en diminuant le niveau de ROS, participe à la protection des cellules normales mais aussi à la pérennisation des cellules tumorales.

### 1. NRF2 et prévention du cancer

Les cellules sont exposées de façon intermittente à différents agents tels que les rayonnements UV, la fumée de cigarette et autres produits cancérigènes... participant au processus de cancérogenèse. Les travaux suivants ont étudié chez des souris *Nrf2*<sup>-/-</sup>, le rôle de Nrf2 dans la protection contre des polluants cancérigènes dans différents tissus murins.

Dans un modèle de souris *Nrf2*<sup>-/-</sup>, il a été montré que celles-ci développaient plus de tumeurs de l'estomac que les souris sauvages après exposition au benzo[a]pyrene, un polluant environnemental et composant majeur de la fumée de cigarette (Ramos-Gomez *et al.*, 2001).

Xu *et al* ont montré que, comparativement à des souris sauvages, des souris *Nrf2*<sup>-/-</sup> avaient une incidence de tumeurs cutanées et un nombre de tumeurs par souris plus important après exposition à des cancérigènes (Xu *et al.*, 2006).

De plus, dans un modèle de souris transgénique exprimant un dominant négatif de Nrf2 dans les kératinocytes basaux épidermiques, il a été montré que l'exposition à deux types de cancérigènes provoque une présence accrue de tumeur de la peau. Ce type d'approche permet de s'affranchir de toute interaction avec un autre hypothétique facteur de transcription qui pourrait se fixer aux ARE. En effet, le dominant négatif Nrf2 se fixe sur les ARE sans recruter le complexe de transcription et en empêchant la molécule sauvage Nrf2 de s'y fixer. Dans le même temps, les auteurs ont vérifié que la diminution de la fixation de Nrf2 aux ARE engendrait bien la diminution d'expression de *GST* et de *NQO1*, cibles de Nrf2 (Keller, auf dem *et al.*, 2006).

L'inflammation chronique peut être à l'origine de cancer du colon et de nombreux autres cancers. Dans une étude exposant des souris à des agents pro-inflammatoires et cancérigènes, les souris *Nrf2*<sup>-/-</sup> surexprimaient la cyclooxygenase-2 et la 5-lipoxygenase, des marqueurs de l'inflammation tissulaires. De plus, le lien entre inflammation et cancer a été confirmé car les souris *Nrf2*<sup>-/-</sup> présentaient une plus forte incidence, un plus grand nombre et une taille plus élevée de tumeurs colorectales (Khor *et al.*, 2008).

Dans une autre étude, Cho *et al* ont démontré que les souris *Nrf2*<sup>-/-</sup> subissaient plus de dommages tissulaires pulmonaires que les souris sauvages dans une atmosphère hyperoxique, une condition permettant d'induire des dommages pulmonaires (Cho *et al.*, 2002).

Enfin, chez l'Homme, il a été montré une plus faible expression de NRF2 dans des lignées cellulaires et cellules tumorales de cancer du sein, les rendant plus exposées aux facteurs cancérigènes. Ce niveau d'expression serait due à la surexpression de Cul3, un acteur du complexe d'ubiquitination Cul3RBX1 (Loignon *et al.*, 2009).

Toutes ces études suggèrent que NRF2 est un facteur de transcription luttant contre la transformation tumorale de la cellule agressée par un toxique. Cette caractéristique a fait de NRF2 une cible potentielle de chimio-prévention anti-cancéreuse.

En effet, la chimio-prévention est une approche visant à prévenir à un stade précoce le développement et la progression tumorale pour réduire l'incidence des cancers.

De nombreuses molécules étudiées pour leur rôle de chimio-prévention des cancers se sont révélées être des activateurs de NRF2. Parmi les molécules extraites des plantes, on note par exemple le sulforaphane (extrait des légumes crucifères), le curcumin, l'epigallocatechine (extraite du thé vert), le resveratrol (extrait du raisin), le wasabi (extrait du raifort) et les composés organosulfurés de l'ail. Des molécules chimiques synthétiques jouent aussi un rôle de chimio-prévention comme par exemple l'oltipraz et le 2-indol-3-yl-methylenequinuclidin-3-ol.

Ces substances activent NRF2 principalement en se fixant aux cystéines de KEAP1, empêchant ainsi sa liaison au complexe d'ubiquitination ou à NRF2. Il en résulte l'augmentation du niveau de NRF2 intra-nucléaire et l'expression de ses cibles.

## 2. NRF2 et promotion du cancer

NRF2 permet une protection des cellules normales mais aussi des cellules tumorales. En effet, il a été montré que l'activation constitutive de NRF2 par son action permanente antioxydante diminuait le niveau de ROS intra-cellulaire favorisant ainsi la survie des cellules cancéreuses. Cette activation peut être due à plusieurs facteurs :

- l'impossibilité de KEAP1 de séquestrer NRF2 dans le cytoplasme,
- une anomalie de NRF2 ou de l'expression de son gène,
- la participation de NRF2/KEAP1 dans les voies impliquées dans le cancer.

### a) *Modification de l'interaction NRF2/KEAP1*

Des anomalies de la séquence du gène *KEAP1* modifieraient sa conformation tertiaire et donc sa fonction ne permettant pas la rétention de NRF2 dans le cytoplasme.

L'augmentation de la signalisation *via* NRF2 a été constatée dans de nombreuses localisations de cancers comme les tumeurs de la sphère ORL (Stacy *et al.*, 2006), du poumons (Ohta *et al.*, 2008), de la peau (Kim *et al.*, 2010), de la vésicule biliaire (Shibata *et al.*, 2008), du sein (Nioi *et al.*, 2007) et de l'endomètre (Jiang *et al.*, 2010).

Ainsi dans le cancer du poumon, plusieurs études ont montré l'importance de NRF2. Dans des lignées cellulaires, des mutations faux sens de *KEAP1* étaient associées à une perte de la répression de NRF2 (Padmanabhan *et al.*, 2006). De plus, Singh *et al* ont montré dans 6 lignées de cancer du poumon sur 12 et dans 10 cancers pulmonaires non à petites cellules sur 54, qu'une mutation, une insertion ou une délétion de *KEAP1* était présente et que ces cellules présentaient une augmentation du niveau de NRF2 associée à la transcription de ses gènes cibles (Singh *et al.*, 2006). De plus, dans une étude portant sur 65 cas de cancer du poumon, il a été décrit une fréquence élevée de mutation de *KEAP1* dans les adénocarcinomes du poumon (Ohta *et al.*, 2008). Wang *et al* ont observé dans des lignées cellulaires et cellules tumorales une diminution d'expression de *KEAP1*, due à l'hyperméthylation de son gène, un mécanisme épigénétique inhibant la transcription. Ceci a été confirmé par la restauration de l'expression de *KEAP1* quand les cellules étaient traitées par la 5-aza-2'-deoxycytidine, un agent déméthylant (Wang *et al.*, 2008).

Dans les cancers du sein, une seule étude réalisée sur la lignée cellulaire Q293 a décrit une inactivation de *KEAP1* et une activation de NRF2 (Nioi *et al.*, 2007).

La majorité des mutations rapportées dans la littérature modifie l'interaction de NRF2 et *KEAP1*.

Dans les cancers du tractus biliaire, des mutations de *KEAP1* ont été retrouvées. En effet, dans l'étude de Shibata *et al*, 4 tumeurs de la vésicule biliaire sur 13 portaient des mutations de *KEAP1* et perdaient l'activité de répression de NRF2 (Shibata *et al.*, 2008).

Dans une autre étude de Shibata *et al* en 2008, les mutations de *NRF2* identifiées dans des cancers pulmonaires et de la sphère ORL étaient rassemblées autour de deux zones, les motifs DLG et ETGE, lieux de fixation à *KEAP1* (Shibata *et al.*, 2008).

De plus, dans une large étude sur 1145 tumeurs issues de multiples organes (œsophage, peau, larynx, poumon, estomac, foie, colon, sein...), il a été retrouvé des mutations dans les tumeurs du poumon, du larynx, de l'œsophage et de la peau. Celles-ci étaient localisées dans la zone de fixation à *KEAP1*, et associées à une localisation

nucléaire de NRF2 démontrée par immunohistochimie. Pratiquement toutes les mutations (95.5%) ont été retrouvées dans des carcinomes suggérant le rôle de NRF2 dans le développement de ce type de tumeurs. Toutes les mutations retrouvées se situaient dans la zone de fixation à KEAP1, suggérant une activation continue de NRF2. Dans les cellules mutées pour *NRF2*, l'étude par immuno-histochimie a montré qu'il y avait expression de *GCLC* et de *NQO1*, deux cibles du facteur de transcription (Kim *et al.*, 2010).

En résumé ces études suggèrent que la perte de fonction de KEAP1 et/ou une mutation de *NRF2* empêchant la liaison KEAP1/NRF2 conduisent à une activation prolongée de NRF2 conférant aux cellules tumorales un avantage de survie *via* l'expression de gènes cibles antioxydants abaissant le niveau de ROS.

*b) Participation de la voie NRF2/KEAP1 dans d'autres voies impliquées dans le cancer*

NRF2 pourrait jouer un rôle dans le potentiel prolifératif de la tumeur et donc son agressivité. En effet, il a été montré une relation directe de NRF2 avec NOTCH1, une protéine régulant le devenir et la prolifération cellulaire et surexprimée dans certains cancers. En se fixant à un ARE situé dans le promoteur de *NOTCH1*, NRF2 a favorisé l'expression de ce dernier (Wakabayashi *et al.*, 2010).

De plus, You *et al* ont démontré que NRF2 interagirait avec la voie p53. La protéine p53 est un facteur de transcription régulant un grand nombre de gènes impliqués dans la survie cellulaire. NRF2 se fixerait sur l'ARE du gène *Mdm2*, un inhibiteur de p53, et participerait à son expression basale. Dans un modèle de fibroblastes embryonnaire murins KO pour *Nrf2*, il a été observé une augmentation de l'expression de p53. De plus, dans des cellules de lignée de cancer ovarien transfectées par un siRNA ciblant NRF2, il a été observé un haut niveau d'activation de p53 associée à augmentation de la mort cellulaire (You *et al.*, 2011).

De façon surprenante, NRF2 pourrait aussi être un répresseur transcriptionnel. En effet, dans des cellules de carcinome, il a été observé que l'expression du *Macrophage Stimulating 1 Recepteur* (MST1R), un récepteur à activité tyrosine kinase surexprimé dans

certains carcinomes et associé au potentiel métastatique, était dépendante de la quantité de NRF2 intra-cellulaire. De plus, cette potentielle répression transcriptionnelle a été renforcée par la mise en évidence d'une fixation de NRF2 sur le promoteur de *MST1R* dans les cellules de cancer du sein. Enfin, le sulforaphane, activateur de NRF2, diminuait l'expression de *MST1R* (Thangasamy *et al.*, 2011).

Dernièrement, les travaux de De Nicola *et al* ont montré dans des fibroblastes d'embryons murins que l'expression des allèles oncogènes *BRaf*, *KRas* et *Myc* dans ces cellules induisaient une diminution du niveau de ROS *via* Nrf2. En effet, il a été observé une augmentation de l'expression de Nrf2 dans les cellules exprimant les oncogènes. De plus, le potentiel oncogénique des cellules exprimant *KRas*<sup>G12D</sup> étaient diminuées dans les cellules *Nrf2*<sup>-/-</sup>. Ces données sont les premières suggérant que des oncogènes contrôlent le programme de détoxification cellulaire *via* NRF2 (DeNicola *et al.*, 2011).

### 3. NRF2 et résistance

NRF2 engendre un phénotype de résistance dans divers types de cancers.

Il a été montré dans trois lignées cellulaires de cancers une corrélation positive entre le niveau de NRF2 intra-cellulaire et la résistance aux chimiothérapies de type doxorubicine, étoposide et cisplatine. En effet, en augmentant le niveau d'expression de *NRF2* par transfection, la résistance aux chimiothérapies de ces cellules augmentait. A l'inverse, en augmentant l'expression de *KEAP1* ou en transfectant un siRNA ciblant NRF2, les auteurs ont observé que le niveau de NRF2 baissait et donc que le niveau de résistance des cellules aux chimiothérapies diminuait (Wang *et al.*, 2008).

Lors de l'étude de la résistance au tamoxifène des cellules de la lignée de cancer mammaire MCF7, il a été retrouvé une surexpression de *NRF2* et des gènes cibles comme *HMOX-1*, *TRX*, *PRX*, and *GCL* dans les cellules résistantes. De plus, lors de l'inhibition d'expression de NRF2 par un siRNA, il existait une abolition partielle de la résistance au tamoxifène (Kim *et al.*, 2008).

Dans des fibroblastes d'embryon murin, Lee *et al* ont établi que les cellules issues de souris *Nrf2*<sup>-/-</sup> étaient plus sensibles à la doxorubicine que les cellules *Nrf2*<sup>+/+</sup>. La buthionine sulfoximine (BSO), molécule abaissant le niveau de glutathion intra-cellulaire,

a provoqué une sensibilité accrue à la doxorubicine dans ces cellules *Nrf2*<sup>-/-</sup> par rapport aux cellules sauvages (Lee *et al.*, 2008).

*HMOX1* est surexprimé dans de nombreux cancers (Jozkowicz *et al.*, 2007). Cette surexpression peut être due à NRF2. En effet, Kim *et al* ont prouvé que les cellules de lignées de cancer du poumon (A549) avaient un haut niveau d'expression de *HMOX1*, *NRF2* et *NFKB1* par rapport à d'autres lignées cellulaires de cancer du poumon et étaient moins sensibles au cisplatine que les autres types cellulaires, concordant avec le niveau d'expression de *HMOX1*. L'expression de *HMOX1* était dépendante de l'expression de *NRF2* et sous l'influence des MAPK (Kim *et al.*, 2008).

Enfin, NRF2 régulerait l'expression de *MRP3* (*Multidrug resistance protein-3*) dans les cancers épithéliaux bronchiques et les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (Mahaffey *et al.*, 2009). *MRP3* fait partie de la famille des *Multidrug resistance associated protein*, de type transporteur ABC (*ATP binding cassette*), qui ont pour fonction d'exporter divers types de molécules dont des drogues utilisées en chimiothérapie anti-cancéreuse.

En résumé, ces études montrent que NRF2, outre son rôle dans la cancérogénèse, participe à la pérennisation des cellules tumorales en activant un programme de détoxification empêchant l'action des thérapeutiques anti-cancéreuses.

## C. NRF2 en hématologie

### 1. NRF2 au cours de l'hématopoïèse

NFE2 et NRF2 possèdent une affinité pour les ARE notamment celui de la  $\beta$ -globine. Certains travaux ont naturellement étudié l'implication de ces molécules dans l'hématopoïèse

Les souris *Nfe2*<sup>-/-</sup> décèdent pour la plupart de saignements dus à une thrombopénie et les survivantes présentent une anémie modérée. Contrairement à *Nfe2*, la suppression de

*Nrf2* ne provoque pas de phénotype particulier et les souris peuvent se développer et se reproduire de façon normale (Chan *et al.*, 1996).

Les souris KO pour les deux gènes *Nfe2* et *Nrf2* ne présente pas de phénotype aggravé par rapport aux souris *Nfe2<sup>-/-</sup>*. Ceci sous entend que *Nrf2* et *Nfe2* ne sont pas indispensables à l'érythropoïèse et à la mégacaryocytopoïèse (Kuroha *et al.*, 1998).

Le niveau de stress oxydatif a été corrélé à la différenciation cellulaire lors de l'hématopoïèse. NRF2 semble participer à sa régulation notamment dans la mégacaryocytopoïèse. En effet, Motohashi *et al* ont montré qu'il existerait une compétition entre *Nfe2* et *Nrf2* pour la liaison aux ARE lors de la mégacaryocytopoïèse. *Nfe2* ayant une faible activité, sa fixation sur les gènes antioxydants favoriserait l'augmentation des ROS contrairement à *Nrf2*. La suppression de *Nrf2* dans les mégacaryocytes favoriserait la maturation cellulaire alors que la suppression de *Nfe2* favoriserait la prolifération des cellules immatures (Motohashi *et al.*, 2010).

## 2. NRF2 en onco-hématologie

Contrairement aux tumeurs solides, il n'a pas été retrouvé de mutations de NRF2 influençant sa liaison à KEAP1 dans les leucémies aiguës. En effet, l'étude du statut mutationnel de *NRF2* dans 100 LAM et 86 LAL n'a retrouvé aucune mutation dans les domaines de liaison à KEAP1 (Kim *et al.*, 2010).

Miyazaki *et al* ont montré que les lignées cellulaires leucémiques U937, HL60 et K562 exprimaient de façon très faible *HO1*, *NRF2* et *BACH1* par rapport aux cellules primaires de LAM. De plus, il existait un niveau accru de *HO1* dans les LAM 4 (leucémie myélo-monocytaire) par rapport aux LAM 1 et 2 (leucémies peu différenciées) suggérant que le niveau de ROS était plus élevé dans les LAM différenciées. NRF2 était principalement intra-nucléaire et BACH1 intra-cytoplasmique dans les cellules primaires alors que l'inverse était observé dans les lignées leucémiques. Dans les LAM, il a été montré par immuno-précipitation de la chromatine (ChIP, *Chromatin Immuno Precipitated assay*) que l'expression de *HMOX1* était la conséquence de la fixation de NRF2 sur l'ARE de son gène (Miyazaki *et al.*, 2010).

Rushworth *et al.*, en voulant expliquer l'inefficacité du bortezomib, un inhibiteur du protéasome, dans le traitement des LAM, ont observé que le niveau de NRF2 intra-nucléaire dans les cellules de LAM était plus important dans celles qui présentaient une résistance au bortezomib. Le bortezomib, en augmentant les ROS dans la cellule, conduit au détachement de BACH1 des ARE, et la préexistence de taux élevé de NRF2 dans le noyaux favoriserait une réponse antioxydante très rapide *via* l'activation transcriptionnelle des gènes antioxydants cibles (Rushworth *et al.*, 2011).

NRF2 est aussi un acteur de la résistance aux inhibiteurs des tyrosines kinases dans la leucémie myéloïde chronique. En effet, en étudiant une lignée cellulaire résistante à l'imatinib, Tarumoto *et al* ont observé une forte fixation de NRF2 à l'ARE du gène de la gamma-glutamyl cystéine synthétase (*GCS*) et un haut niveau de GSH intra-cellulaire. Ces cellules ayant un mécanisme de résistance à l'imatinib autre que ceux principalement rencontrés, cette étude a montré une implication de NRF2 dans ce mécanisme de résistance. Cette résistance a été levé par le traitement par acide ascorbique qui a provoqué la diminution du niveau de GSH intra-cellulaire, de l'expression de *GCS*, et des complexes NRF2/ARE de la *GCS* (Tarumoto *et al.*, 2004).

Au total, les études sur NRF2 dans les hémopathies malignes sont très récentes et peu nombreuses. Comme dans les tumeurs solides, elles suggèrent que ce facteur de transcription pourrait participer à la régulation du métabolisme oxydatif dans ces affections.

# **DEMARCHE EXPERIMENTALE**

## STRATEGIE EXPERIMENTALE

Des travaux de recherche récents (transcriptome), sous la direction du Pr Hérault à Tours, ont mis en évidence une sous-expression d'un grand nombre de gènes cibles de NRF2 dans les cellules leucémiques au contact d'éléments de la niche hématopoïétique (CSM).

Comme cette interaction induit concomitamment une diminution du niveau de ROS dans les cellules leucémiques, cette thèse se propose d'étudier si NRF2 intervient dans le métabolisme oxydatif des cellules de LAM. Pour se faire, nous avons induit des variations du niveau de ROS dans les cellules leucémiques et étudié la localisation subcellulaire de NRF2 et l'expression des gènes cibles par qRTPCR.

Les cellules ont été exposées pendant 4 h et 24 h : (1) à la N-acétyl-cystéine (NAC), molécule antioxydante stimulant la synthèse de glutathion et possédant une fonction thiol participant à la réduction des ROS ; (2) à la buthionine sulfoximine (BSO), molécule pro-oxydante inhibant la gamma-glutamyl synthétase abaissant ainsi le niveau de glutathion ; et (3) au sulforaphane (SFN), un isothiocyanate qui en se liant à KEAP1 provoque la libération de NRF2.

L'étude a été réalisée sur la lignée KG1a (LAM indifférenciée, M0 M1) et la lignée THP1 (LAM à différenciation monocytaire, M5). Les effets de la NAC, de la BSO et du SFN ont été étudiés sur la cytologie, la cellularité, le niveau de stress oxydatif, la localisation subcellulaire de NRF2 par western blot et microscopie confocale et l'expression de différents gènes par qRTPCR :

- *NRF2*, *KEAP1* et *BACH1*
- des cibles connues de NRF2, *HMOX1*, *SOD1*, *PRDX1*, *NQO1* et *GCLC*,
- et *GPX3*, une enzyme antioxydante dont le rôle a été établi dans le métabolisme oxydatif de CSL (Hérault *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus établissent que les variations du niveau de ROS dans les cellules leucémiques modifient la localisation subcellulaire de NRF2 et l'expression de certains de ses gènes cibles dont *HMOX1*.

# MATERIELS ET METHODES

## A. Cellules

Les lignées leucémiques étudiées sont KG1a et THP1. KG1a (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) est une lignée de LAM indifférenciée (LAM 0-1, classification FAB) possédant le phénotype suivant CD3-, CD13+, CD14-, CD15+, CD19-, CD33+, CD34+. THP1 (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) est une lignée de LAM à différenciation monocyttaire (LAM 5, classification FAB) et possède le phénotype suivant CD3-, CD4+, CD13+, CD15+, CD19-, CD34-, cyCD68+, HLA-DR+.

Les cultures ont été réalisées sous hotte à flux laminaire vertical. Le milieu de culture était composé de : MEM Alpha (GIBCO, Invitrogen, Royaume-Uni) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Hyclone<sup>®</sup>, Perbio, Brebieres, France), 1% de pénicilline streptomycine (GIBCO), 1% de L-glutamine (GIBCO) et 0,01% de fungizone. Les cultures étaient réalisées dans des flasques de 150 cm<sup>2</sup> (BD Falcon, Oxford, Royaume-Uni) à la concentration de  $0,5 \cdot 10^6$  cellules/mL. Les cellules ont été mises en présence de N-acetylcystéine (NAC), un agent antioxydant, à la concentration de 100 µM et de buthionine sulfoximine (BSO), molécule pro-oxydante, à la concentration de 500 µM pendant 4 h et 24 h à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>. Chaque expérience a été réalisée trois fois pour chaque lignée. Une expérience sur les KG1a a inclus une autre condition, l'exposition au sulforaphane (SFN, dilué dans le diméthylsulfoxyde, DMSO), un inducteur de la migration intra-nucléaire de NRF2, utilisé à la concentration de 5 µM. La NAC, la BSO et le SFN provenaient de chez Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

## B. Cellularite, viabilité et cytologie

Pour chaque type cellulaire, il a été effectué une numération des cellules en utilisant une cellule de comptage FastRead 102<sup>®</sup> (ImmuneSystem, Royaume-Uni) pour chaque condition et chaque temps. Une dilution au dixième dans du milieu de culture puis une dilution au demi dans du bleu Trypan (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) des

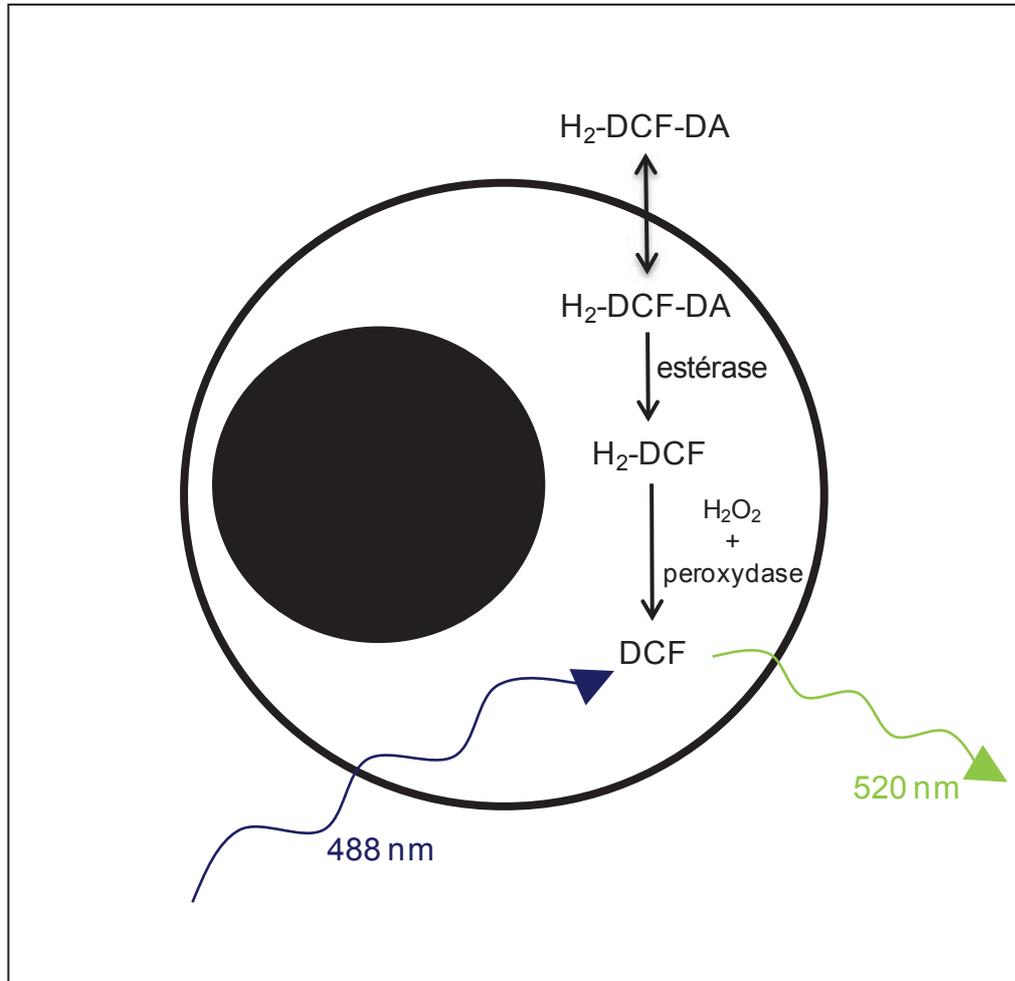
cellules ont été faites avant lecture. La viabilité a été évaluée en comptant les cellules colorées par le bleu Trypan (considérées mortes).

Les cellules ont été projetées sur lame par cyto-centrifugation sur centrifugeuse Cytospin<sup>®</sup> (Shandon Lipshaw, Pittsburgh, Indiana, USA) puis colorées par technique May-Grünwald Giemsa. Les photos de cellules ont été acquises sur un microscope optique Leica<sup>®</sup> (Wetzlar, Allemagne).

### **C. Niveau de peroxyde d'hydrogène par cytométrie en flux**

Les expériences ont été réalisées avec un cytomètre en flux FACS Quanto II<sup>™</sup> (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) équipé d'un laser argon à 488 nm. Pour évaluer le niveau d' $H_2O_2$  dans les lignées leucémiques, les cellules ont été marquées par le 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester ( $H_2$ -DCF-DA, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Celui-ci pénètre passivement dans les cellules où il est clivé en  $H_2$ -DCF par les estérases cytosoliques. Le  $H_2$ -DCF est oxydé par des peroxydases en présence de  $H_2O_2$  intra-cellulaire. La molécule résultante, le dichlorofluoresceine, est fluorescente avec un pic d'excitation à 488 nm et un pic d'émission à 520 nm (Figure 6).

Le marquage a été réalisé après un lavage par centrifugation (500g, 5 min) en tampon phosphate salin (PBS) puis en X-vivo<sup>®</sup> (Lonza, Walkersville, USA) à 37°C. Il consiste en une incubation avec le  $H_2$ -DCF-DA (2  $\mu$ M) pendant 10 min à 37°C. La fluorescence a ensuite été mesurée par cytométrie en flux en calculant les moyennes géométriques des intensités de fluorescence comparativement à l'autofluorescence (bruit) obtenue des cellules non marquées. Les histogrammes de distribution de fréquences des fluorescences ont été obtenus pour chaque condition avec le logiciel FlowJo<sup>®</sup> (Tree Star, Inc. Ashland, USA).



**Figure 6 : Principe du marquage par le DCFDA**

Le  $H_2\text{-DCF-DA}$  passe la membrane cytoplasmique de façon passive, puis est transformée en  $H_2\text{-DCF}$ , molécule hydrophile piégée dans la cellule. Sous l'action de peroxydase intracellulaire et de manière proportionnelle au niveau de  $H_2O_2$ , le  $H_2\text{-DCF}$  va être transformé en  $\text{DCF}$ , molécule fluorescente. L'excitation et l'émission de fluorescence se font à  $488\text{nm}$  et  $520\text{nm}$  respectivement.

## D. Etude protéique

### 1. Extraction protéique cytoplasmique et nucléaire

L'extraction a été réalisée sur la glace. Elle consistait en l'exposition du culot cellulaire ( $5 \cdot 10^6$  cellules) à un premier tampon (25  $\mu$ L) composé de Hepes 20 mM, de KCl 10 mM, d'EDTA 1 mM, de  $\text{NPO}_4$  0,2%, de glycerol 10% et d'eau. Ce tampon détruit les membranes cytoplasmiques et permet la récupération après centrifugation (12000 g, 2 min) du surnageant contenant les protéines cytoplasmiques. Le culot contenant les noyaux a ensuite été exposé à un deuxième tampon (25  $\mu$ L) composé de NaCl 0,4 M, de glycerol 20%, d'Hepes 20 mM, de KCl 10 mM, d'EDTA 1 mM et d'eau. Pour détruire la membrane nucléaire, le culot a été incubé et centrifugé (16000 g, 5 min). Le surnageant récupéré contenait les protéines nucléaires.

### 2. Dosage des extraits protéiques

Le dosage des extraits protéiques a été réalisé avec de l'acide bicinchoninique (BCA, Sigma Aldrich) qui réagit avec les ions  $\text{Cu}^+$ . Ceux-ci sont générés par la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  par les protéines. Le complexe BCA- $\text{Cu}^+$  produit une réaction colorée proportionnelle à la quantité de protéine dans l'échantillon et mesurable par spectrophotométrie à 562 nm. Après réalisation d'une gamme d'albumine sérique bovine, le mélange BCA associé au  $\text{CuSO}_4$  (Sigma-Aldrich) a été ajouté dans la gamme et les échantillons à doser. La réaction a été effectuée à 37°C dans l'obscurité pendant 30 min. La lecture a été effectuée à 590 nm sur le spectrophotomètre Dynex<sup>®</sup> (Magellan Biosciences, Chantilly, USA).

### 3. Western blot

Le SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) a été réalisé en utilisant un gel à 10% (Pro Pure Next Gel 10%, Amresco, Solon, USA) dans une cuve Bio-rad (Hempstead, Royaume-Uni). Les échantillons, correspondants à l'équivalent protéique de  $5 \cdot 10^6$  cellules ou à 30 ou 40  $\mu$ g d'extraits protéiques cytoplasmiques ou nucléaires, ont été dilués au sixième dans une solution de Laemmli et de  $\beta$ -mercapto-éthanol ( $1/10^{\text{ème}}$ ) pour dénaturer les protéines. Les échantillons ont ensuite été déposés dans le gel.

La migration a été effectuée sous une tension de 150 V à température ambiante pendant 75 min dans un tampon de migration (Pro Pure Next gel running buffer, Amresco, Solon, USA). Le poids moléculaire des protéines séparées a été déterminé par comparaison avec un marqueur de taille (Précision plus Protein Standard, Bio-Rad) soumis simultanément à l'électrophorèse sur le même gel.

Le transfert sur membrane de di-fluorure de polyvylène (PVDF) a été ensuite réalisé par électrophorèse à 250 mA pendant 90 min, dans une solution tampon (Tris 25 mM, glycine 190 mM, MeOH 20%) à 4°C. Le blocage des sites d'interaction non spécifiques entre la membrane et les protéines a été réalisé en plongeant la membrane dans une solution contenant un détergent : TBST (Tris pH 8 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%) et des protéines de lait de vache (Regilait®) à 5% pendant 1 h à température ambiante. Les anticorps utilisés pour les western blots proviennent de chez RnD System (Abingdon, Royaume-Uni) pour l'anticorps anti-NRF2, Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, Californie, USA) pour l'anticorps anti-RAF1 et d'un sérum purifié humain pour l'anticorps anti-Topoisomérase I (offert par le Dr Fabrice Gouilleux, UMR CNRS 6239, France). Les contrôles de charge et de pureté des extraits protéiques étaient les suivants : anticorps anti-RAF1 pour le contrôle cytoplasmique et anti-Topoisomérase I pour le contrôle nucléaire. Les anticorps primaires ont été utilisés soit pendant toute une nuit à 4°C (anticorps anti-NRF2, 1/500<sup>ème</sup>) ou pendant 1 h à température ambiante (anticorps anti-RAF1 et anti-Topoisomérase I, 1/1000<sup>ème</sup>). Après plusieurs lavages, les membranes ont été exposées pendant 1 h à température ambiante aux anticorps secondaires : anti-souris pour NRF2 (Goat anti-mouse HRP, Bio-Rad), anti-lapin pour RAF1 (Goat anti-rabbit HRP, Bio-Rad) et anti-humain HRP pour la Topoisomérase I. L'anticorps a été révélé par une solution contenant du luminol qui est dégradé par la peroxydase de raifort (HRP) au contact des anticorps secondaires générant de la lumière (Amersham ECL Plus®, GE HealthCare, Buckinghamshire, Royaume-Uni). La détection a été obtenue par camera de chimiluminescence. Le logiciel ImageJ® (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) a été utilisé pour mesurer l'intensité des bandes des westerns blots. Le rapport de la densité de l'échantillon sur la densité de la bande du témoin nucléaire a été calculé pour chaque condition.

## E. Etude en microscopie confocale

La microscopie confocale permet grâce à un système optique l'acquisition d'image provenant d'un seul plan. L'objet à étudier est illuminé par un ou plusieurs lasers puis la fluorescence émise par la cible d'intérêt est recueillie par des photomultiplicateurs. Il y a ensuite une reconstruction numérique de l'image obtenue.

L'immuno-marquage a été réalisé sur  $10^6$  cellules pour chaque condition. Les cellules ont été lavées 2 fois en PBS puis exposées pendant 15 min au formaldéhyde 3,7% à température ambiante. Après 2 lavages en PBS, les cellules ont ensuite été perméabilisées dans un tampon de perméabilisation (PBS 1X, 0.5% Tween, 1% BSA) pendant 1 h à température ambiante. L'anticorps primaire anti-NRF2 (R'n'D System) a été dilué au 1/50 dans le tampon de perméabilisation et mis en présence des cellules pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages doux, l'anticorps secondaire anti-mouse couplé au fluorochrome Alexafluor 594 (Invitrogen) a été utilisé dilué dans le tampon de perméabilisation au 1/250 et mis en présence du culot cellulaire pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, une goutte du culot a été déposée sur des lamelles préalablement tapissées de polylysine (exposition des lamelles pendant 1 h à 37°C dans polylysine 0,01%). Les cellules sur lamelles ont été incubées à 37°C pendant 30 min pour adhérence de celles-ci à la lamelle. Enfin avant montage des lamelles sur lame, une goutte de Vectashield Hard Set (Vector Laboratories, Burlingame, USA) est déposée sur la lamelle. Ce produit contient du DAPI, un fluochrome intercalant marquant l'ADN, et polymérise stabilisant les cellules dans le milieu de montage.

L'acquisition des images a été réalisée sur un microscope confocal à balayage laser Olympus FV500<sup>®</sup> équipé d'un laser Hélium Néon vert émettant à 540 nm et d'une diode bleue émettant à 405 nm. Le logiciel pilotant le microscope était Fluoview<sup>®</sup> (Olympus America, Center Valley, USA). L'analyse d'image a été réalisée sur le logiciel Imaris v7 (Bitplane Scientific Software, Zurich, Suisse)

## F. Etude du niveau d'expression des gènes

### 1. Extraction des acides ribonucléiques (ARN) totaux

Le culot cellulaire de  $5 \cdot 10^6$  cellules pour chaque condition a été lavé en PBS 1X puis mis dans 1mL de Trizol. Après ajout de chloroforme et agitation, les échantillons ont été centrifugés (12000 g, 15 min, 4°C). La phase aqueuse contenant les ARN a été récupérée puis une deuxième extraction au chloroforme a été réalisée. La précipitation de l'ARN a été provoquée en ajoutant de l'isopropanol. Après une centrifugation (12000 g, 10 min, 4°C), le culot d'ARN a été lavé deux fois à l'éthanol 75%. Après assèchement du culot d'ARN, celui-ci a été remis en suspension dans 20 µL d'eau traitée par diethylpyrocarbonate (DEPC) puis congelé à -20°C au moins une heure.

### 2. Quantification et contrôle de la qualité des ARN

Les ARN obtenus ont été quantifiés à l'aide du spectrophotomètre UV Nanodrop® ND-1000 (Labtech, Paris, France). La pureté de l'échantillon d'ARN a été apprécié selon les rapports suivants : le ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  évalue la présence de protéine (absence si entre 1,8 et 2,1), le ratio  $DO_{260}/DO_{230}$  évalue la pureté de l'ARN.

La qualité de l'ARN a été contrôlée par électrophorèse capillaire sur Bioanalyzer Agilent 2100® (Agilent Technologies, Massy, France) puis en établissant le *RNA Integrity Number* (RIN), prenant en compte le rapport des ARN 16S , 18S et l'ARN dégradé.

### 3. Retro-transcription des ARN

La rétrotranscription a été réalisée avec le kit Superscript VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) selon les recommandations du fournisseur. La réaction comprenait l'échantillon d'ARN, la transcriptase inverse, un inhibiteur de RNase, du  $MgCl_2$ , des amorces et des dNTP. Le mélange a été incubé à 42°C pendant 1 h, à 85°C pendant 5 min puis conservé dans la glace.

#### 4. Contrôle de la retro-transcription par PCR

Une PCR a été réalisée en utilisant des amorces ciblant l'ADNc du gène de la  $\beta$ -actine1 (*ACTB*). Le mélange réactionnel contenait des dNTPs, les amorces, la Taq polymérase, une solution tampon et le cDNA. Le thermocycleur BIOMETRA<sup>®</sup> (Biolabo Scientific Instrument, Archamps, France) a été utilisé avec le programme suivant : pré incubation à 94°C pendant 3 min, 35 cycles d'amplification (94°C pendant 30 sec, 60°C pendant 60 sec et 72°C pendant 30 sec) et enfin 72°C pendant 7 min puis refroidissement à 8°C. Une électrophorèse sur gel d'agarose 2% du produit de PCR a été ensuite réalisée. Le gel contenait du bromure d'éthidium, agent intercalant fluorescent après excitation aux ultra-violets, ce qui a permis de révéler la bande unique à la taille attendue (134 pb) correspondant au gène de la  $\beta$ -actine1, témoin de l'absence d'ADN génomique.

#### 5. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative a été réalisée avec des sondes *Universal Probe Library*<sup>®</sup> (UPL, Roche, Penzberg, Allemagne). Ces sondes sont constituées de 8 à 9 nucléotides complémentaires de séquences d'ADN humain. Elles sont au nombre de 165 et permettent de couvrir une grande partie du transcriptome. En 5' de chaque sonde est fixé un fluorochrome (rapporteur) qui est inhibé par un extincteur (quencher) en 3' par le principe de transfert d'énergie. Lors de l'hybridation des amorces et extension de celles-ci, l'ADN polymérase, par son activité 3'-5' exonucléasique, dégrade la sonde et libère le rapporteur qui émet de la fluorescence captée par le capteur du thermocycleur LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche, Mannheim, Allemagne). Une mesure de la fluorescence a été faite tous les cycles. Le logiciel propose un Ct (*cycle threshold* ou cycle seuil) correspondant au cycle où la courbe du signal de fluorescence commence à être exponentielle. Un coefficient d'expression ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ ) peut être calculé pour chaque gène étudié en prenant comme référence un gène de « ménage », ici celui codant pour la Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Ensuite, le coefficient de variation de l'expression d'un gène dans une condition a été calculé par rapport à l'expression de ce même gène dans une condition référence, *Relative Quantification*,  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (avec  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{GAPDH}}) - (Ct_{\text{gène ref}} - Ct_{\text{GAPDH ref}})$ ). Les couples d'amorces ont été préalablement validés avec une efficacité proche de 2. Chaque couple d'amorce était testé sur une série de

dilution d'ADNc issu d'ARN total humain (Stratagene<sup>®</sup>, Agilent Technologies, Massy, France).

Les mélanges réactionnels ont été distribués dans des plaques 384 puits par l'automate EpMotion<sup>®</sup> 5070 (Eppendorf, Hamburg, Allemagne).

La condition référence correspondait aux cellules KG1a ou THP1 non exposées à la NAC, BSO et SFN pour chaque temps étudié (H4 et H24). Les analyses ont été réalisées trois fois pour chaque condition.

# RESULTATS

## A. Cytologie

Les cellules KG1a, colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG), présentaient un aspect blastique avec une grande taille, un cytoplasme basophile, une chromatine fine avec un ou plusieurs volumineux nucléoles. Cet aspect n'a pas été modifié par l'exposition à la NAC, la BSO et le SFN (Figure 7).

Les cellules THP1, colorées au MGG, présentaient un aspect blastique de type monocytoïde avec une grande taille, un cytoplasme basophile contenant des vacuoles, un noyau parfois encoché, une chromatine fine avec un ou plusieurs nucléoles. Cet aspect n'a pas été modifié par l'exposition à la NAC ou à la BSO.

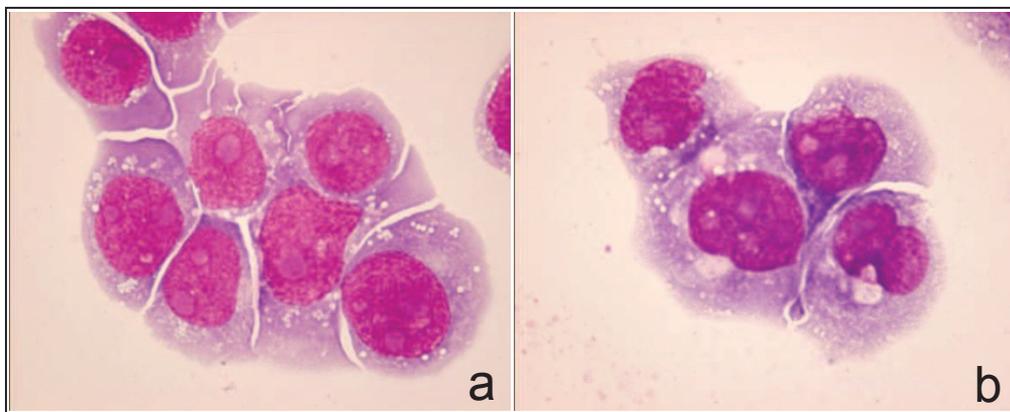
## B. Cellularité

La NAC et la BSO n'ont pas induit de modifications de la cellularité ni de la viabilité toujours supérieure à 95 % que ce soit pour les cellules KG1a ou les cellules THP1 (Figure 8).

## C. Evaluation du niveau de peroxyde d'hydrogène par cytométrie en flux

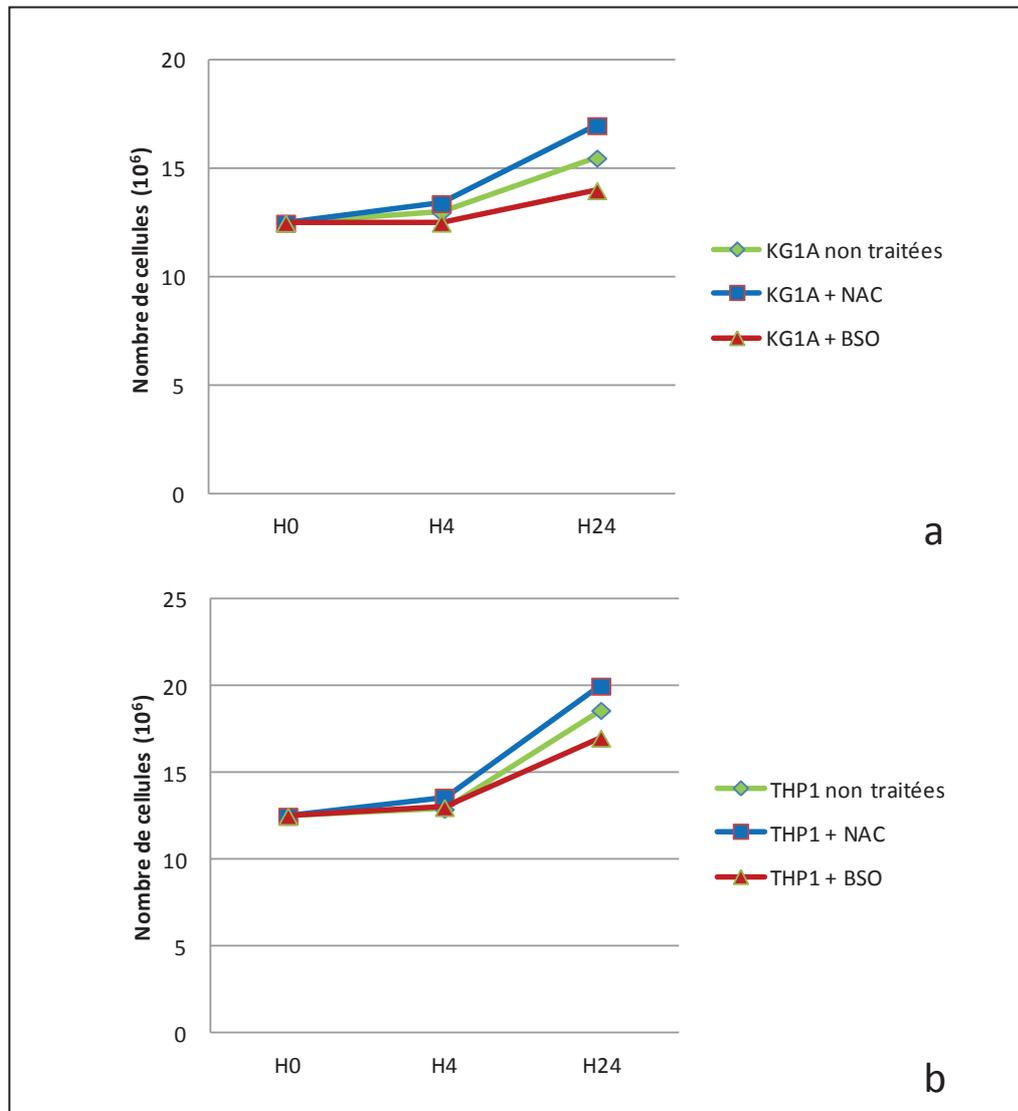
L'évaluation du niveau de DCF dans les cellules KG1a a révélé une augmentation du niveau de peroxyde d'hydrogène de 19% ( $\pm$  10%) et 124% ( $\pm$  35%) après respectivement 4 h et 24 h d'exposition à la BSO. Il n'a pas été observé de diminution significative du niveau de ROS dans ces cellules exposées à la NAC (Figure 9.a).

Le niveau d' $H_2O_2$  dans les cellules THP1, après exposition à la BSO, a été augmenté de 4% ( $\pm$  5%) et 40% ( $\pm$  8%) pendant 4 h et 24 h respectivement. Il n'a pas été observé de diminution significative du niveau de ROS dans ces cellules exposées à la NAC (figure 9.b).



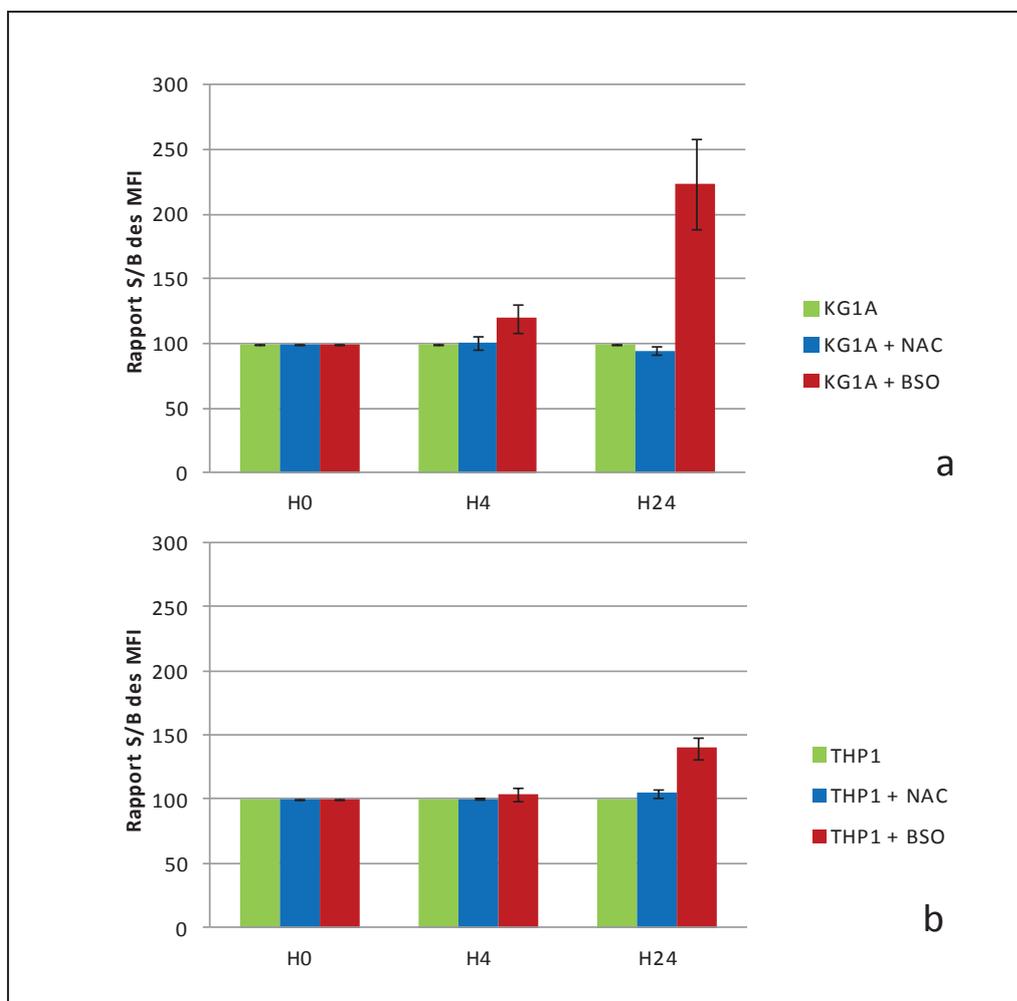
**Figure 7 : Aspect cytologique des cellules KG1a et THP1.**

Aspect blastique immature des cellules KG1A (a), et blastique monocytoïde des cellules THP1 (b). L'aspect des cellules KG1a et THP1 n'a pas été modifié par l'exposition à 100  $\mu$ M de NAC, 500  $\mu$ M de BSO, 5 mM de DMSO ou à 5  $\mu$ M de SFN (non montrés). Images obtenues après cyto-centrifugation et coloration au MGG. Grossissement X600.



**Figure 8 : Evolution de la cellularité des cellules KG1a et THP1 non traitées et traitées par la NAC ou la BSO.**

Les cellules KG1a (a) et THP1 (b) étaient ensemencées à  $0,5 \cdot 10^6$  cellules par mL. Les cellules ont été exposées à  $100 \mu\text{M}$  de NAC ou  $500 \mu\text{M}$  de BSO ( $n=1$ ).



**Figure 9 : Fluorescence des cellules KG1a et THP1 marquées au H<sub>2</sub>-DCF-DA**

Rapport signal/bruit des moyennes géométriques de fluorescence du DCF pour chaque temps comparé aux conditions KG1a (a) et THP1 (b) non traitées. Culture en présence de N-acétylcystéine (NAC) à 100  $\mu$ M ou de buthionine sulfoximine (BSO) à 500  $\mu$ M pendant 4 h et 24h.

#### **D. Localisation intra-cellulaire de NRF2**

Les western blots ont été réalisés avec une quantité fixe de protéine pour les extraits nucléaires et cytoplasmiques : 30 µg et 50 µg respectivement. Ceux-ci ont révélé la présence de NRF2 dans les noyaux des cellules THP1 mais pas dans les cellules KG1a (données non montrées) (Figure 10a). Dans les cellules THP1, la quantification densitométrique des bandes obtenues à partir des extraits nucléaires suggère une augmentation de NRF2 en présence de BSO et une diminution en présence de NAC. En effet, en comparant les ratios des densités des bandes de NRF2 et de la Topoisomérase I dans chaque condition, il semblerait exister une diminution de NRF2 dans les noyaux des cellules exposées à la NAC et une augmentation de celle-ci dans les noyaux exposés à la BSO (Figure 10b).

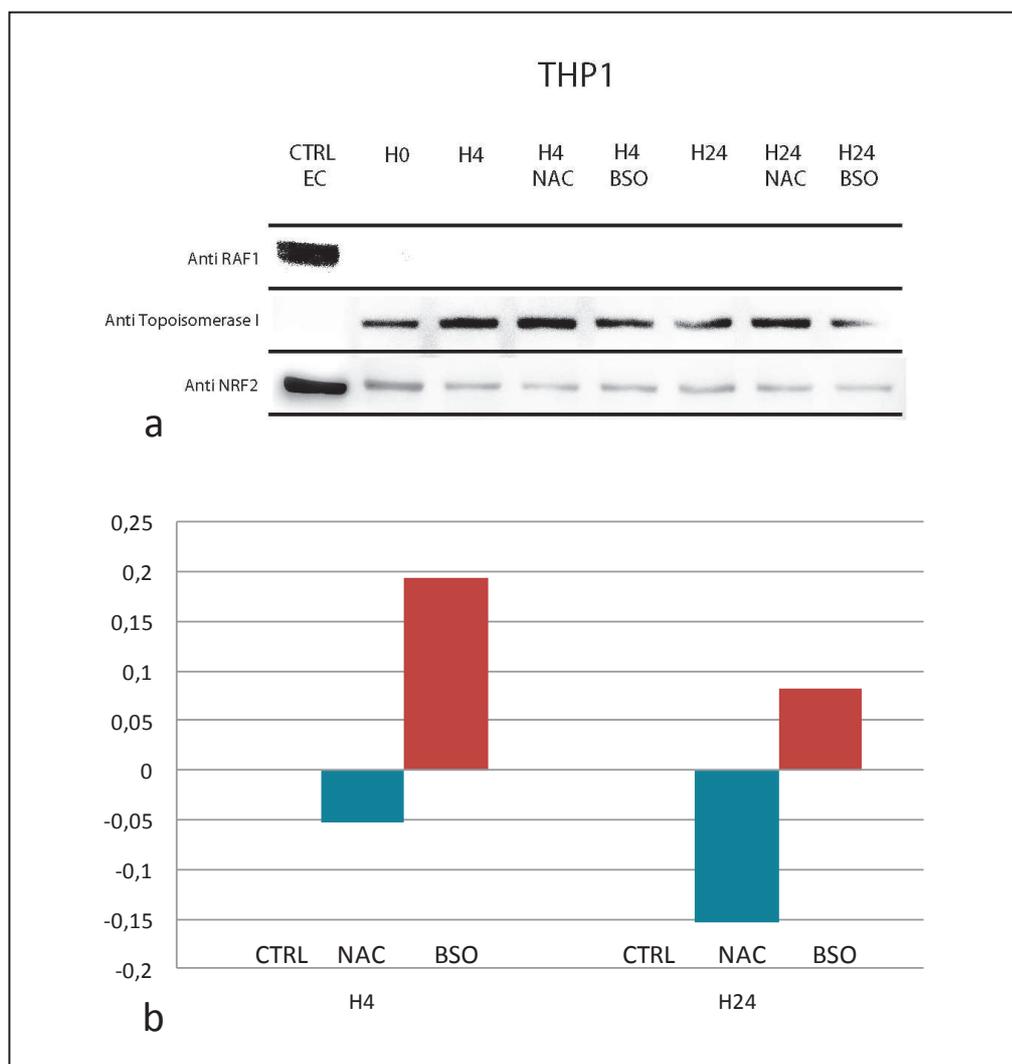
#### **E. Localisation subcellulaire de NRF2 en microscopie confocale**

L'analyse par microscopie confocale de la localisation subcellulaire de NRF2 a mis en évidence un niveau très faible de NRF2 intra-nucléaire dans les cellules KG1a comparativement aux cellules THP1 (figure 11 et 12).

Les cellules ont été exposées à la N-acétyl-cystéine (NAC, 100 µM), à la buthionine sulfoximine (BSO, 500 µM) et au sulforaphane (SFN, 5 µM) pendant 24 h.

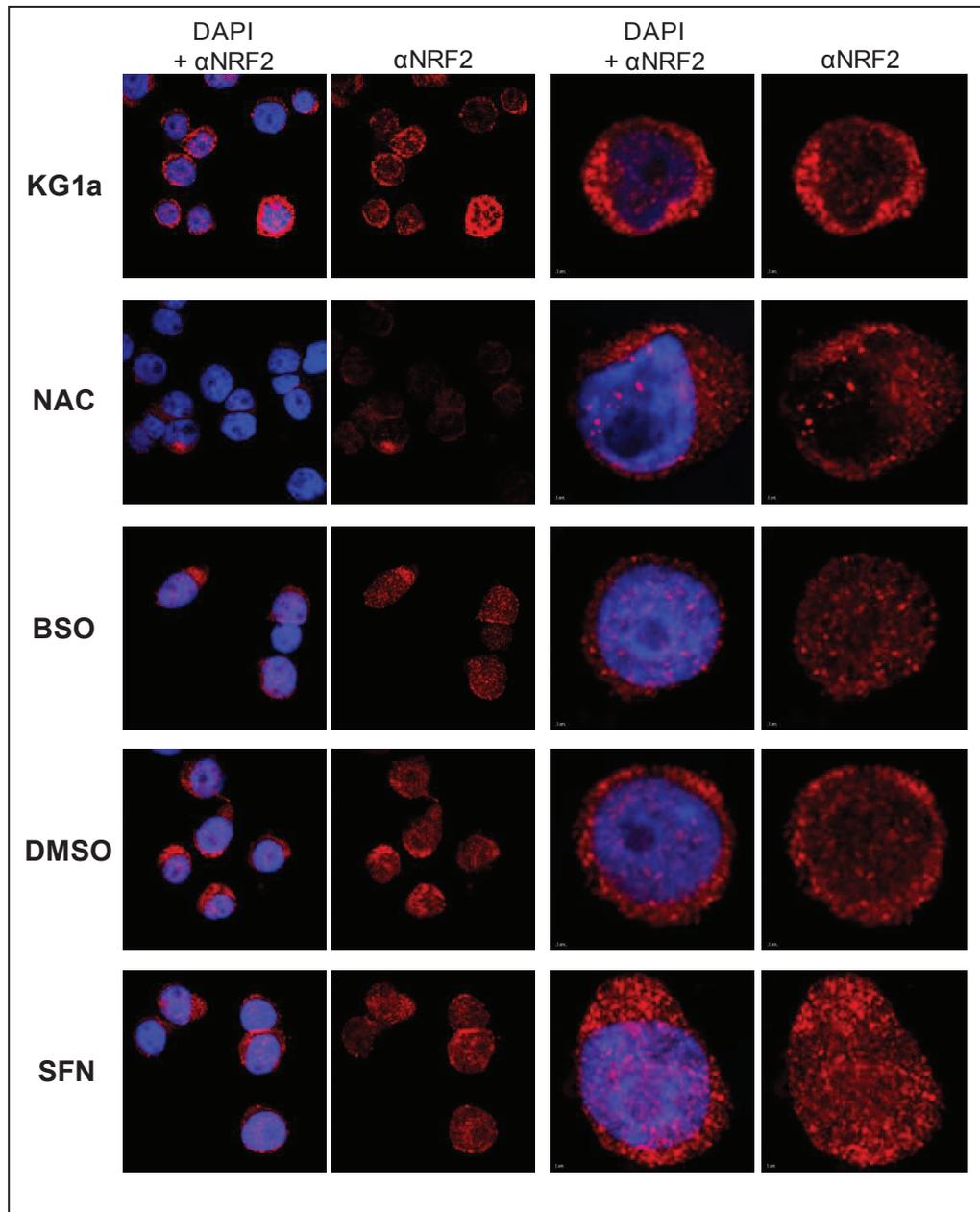
La quantité de NRF2 intra-nucléaire était faible dans les cellules KG1a non traitées. L'exposition à la NAC a diminué la quantité détectée. En revanche, le traitement par BSO a induit une forte augmentation intra-nucléaire de NRF2 avec une diminution de la quantité cytoplasmique. Enfin, l'exposition au SFN a elle aussi induit un fort renforcement du signal de NRF2 dans le noyau.

Les mêmes résultats ont été obtenus mais de façon plus intense dans la lignée THP1.



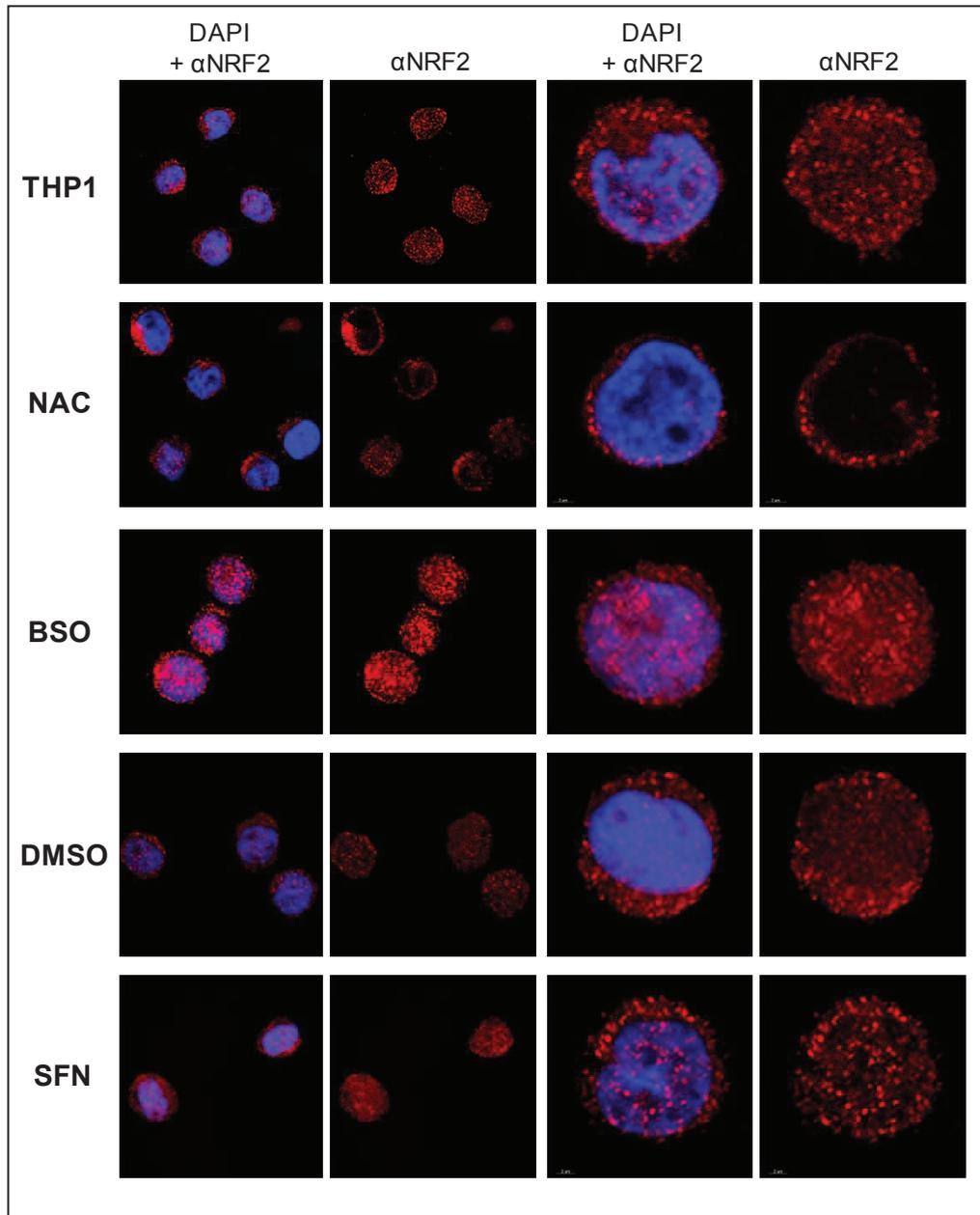
**Figure 10 : Variation de NRF2 dans les extraits nucléaires des cellules THP1 en fonction de l'état oxydatif.**

Les cellules THP1 ont été exposées à 100  $\mu$ M de N-acetyl-cystéine (NAC) ou 500  $\mu$ M de buthionine sulfoximine (BSO) pendant 4 h et 24 h (a). CTRL EC : contrôle extrait cytoplasmique. Les bandes du western blot ont été intégrées par densitométrie. La quantité relative de NRF2 est représentée pour chaque temps par rapport aux cellules non traitées. CTRL: contrôle.



**Figure 11 : Localisation subcellulaire de NRF2 dans les cellules KG1a.**

Les cellules ont été exposées à la N-acétyl-cystéine (NAC, 100  $\mu$ M), à la buthionine sulfoximine (BSO, 500  $\mu$ M), et au sulforaphane (SFN, 5  $\mu$ M) pendant 24 h. Le DMSO correspond au contrôle négatif du SFN (même quantité que SFN). Les noyaux ont été marqués au DAPI et NRF2 avec l'AlexaFluor 594.



**Figure 12 : Localisation subcellulaire de NRF2 dans les cellules THP1.**

Les cellules ont été exposées à la N-acétylcystéine (NAC, 100  $\mu$ M), à la buthionine sulfoximine (BSO, 500  $\mu$ M) et au sulforaphane (SFN, 5  $\mu$ M) pendant 24 h. Le DMSO correspond au contrôle négatif du SFN (même quantité que SFN). Les noyaux ont été marqués au DAPI et NRF2 avec l'AlexaFluor 594.

## F. Expression des gènes cibles de NRF2

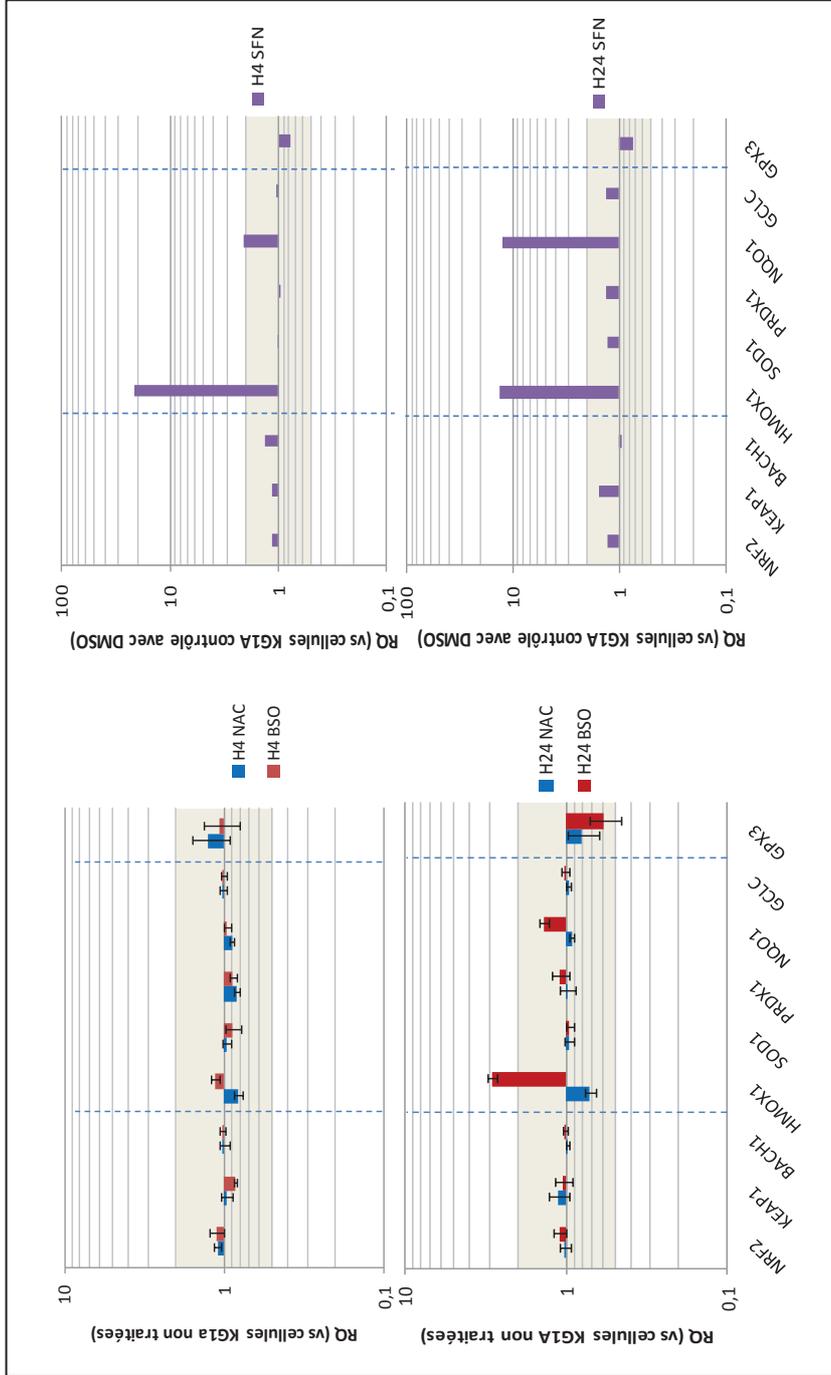
L'expression de *NRF2*, *KEAP1* et *BACH1* a été étudiée ainsi que celles de gènes cibles connus de NRF2 (*HMOX1*, *NQO1*, *GCLC*, *PRDX1*, *SOD1*). Nous avons de plus étudié l'expression de *GPX3* qui n'est pas connu pour être une cible de NRF2 (Figure 13 et 14).

Il n'a pas été observé de variation de l'expression de ces gènes au bout de 4 h d'exposition à la NAC ou à la BSO. En revanche, après 24 h d'exposition, il a été observé une surexpression de *HMOX1* (RQ = 2,8±0.19) avec la BSO sans autre modification significative. La surexpression de *HMOX1* a aussi été observée en présence de SFN, utilisé comme contrôle positif de la translocation nucléaire de NRF2 après dissociation du complexe NRF2/KEAP1.

La différence d'expression de *HMOX1* après 4 h d'exposition au SFN et à la BSO suggère que la cinétique de dissociation du complexe NRF2/KEAP1 était beaucoup plus lente avec la BSO qu'avec le SFN.

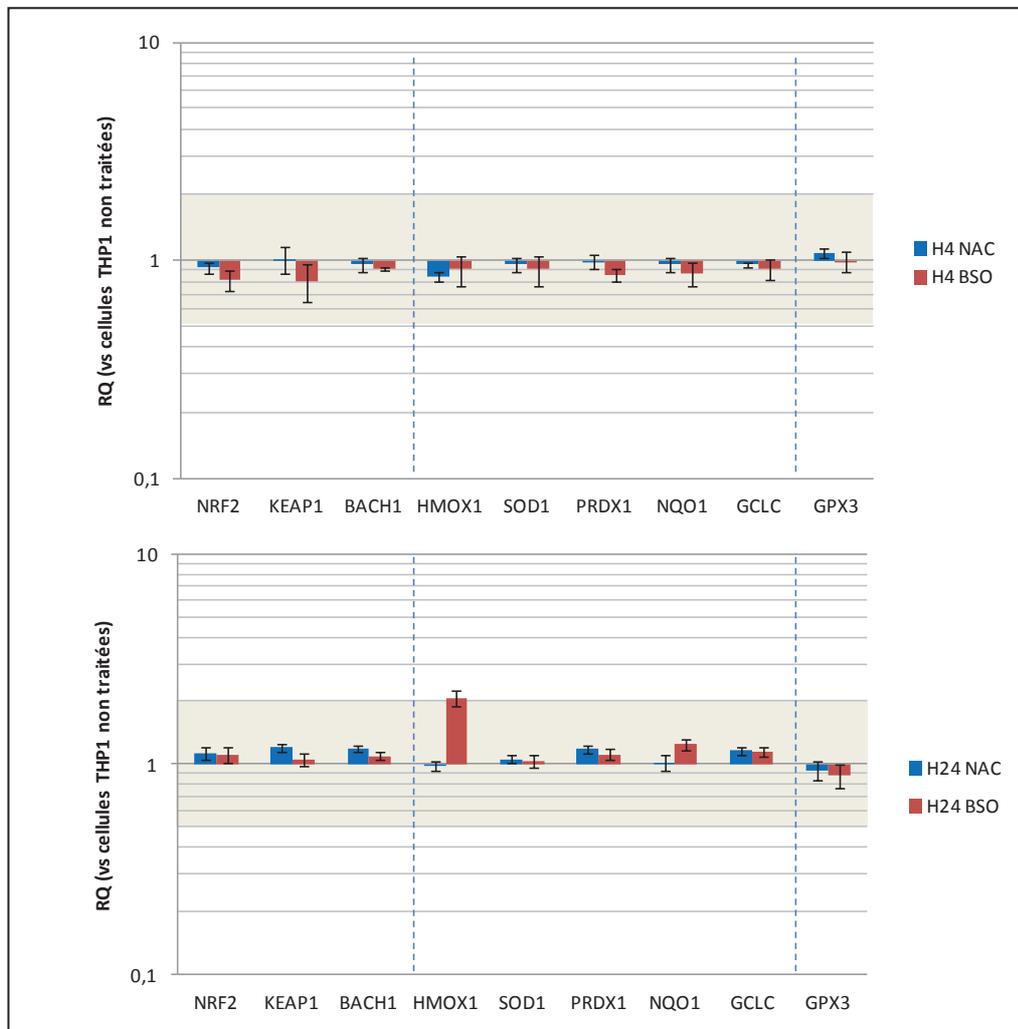
Il est intéressant de souligner que les différents agents modificateurs du stress oxydatif n'ont pas modifié l'expression des gènes *NRF2*, *KEAP1* et *BACH1*, ni celle de *GPX3*.

Ces résultats obtenus à la fois sur les cellules de lignée KG1a et THP1 suggèrent une translocation nucléaire fonctionnelle de NRF2 induite par le stress oxydatif.



**Figure 13 : Effet de la NAC et de la BSO sur l'expression de différents gènes du métabolisme oxydatif dans les cellules KG1a.**

Niveau d'expression de *NRF2*, *KEAP1*, *BACH1* et des gènes antioxydants (*HMOX1*, *SOD1*, *PRDX1*, *NQO1*, *GCLC* et *GPX3*) dans cellules KG1a exposées à la N-acétyl-cystéine (NAC, 100  $\mu$ M) ou à la buthionine sulfoximine (BSO, 500  $\mu$ M) pendant 4 h (a) et 24 h (c) par rapport aux cellules non traitées du temps correspondant (RQ = 1) (n = 3). L'exposition au sulforaphane, activateur de *NRF2*, est un contrôle positif de l'action de *NRF2* à 4 h (b) et à 24 h (d) (n=1). Zone grise : non significatif.



**Figure 14 : Effet de la NAC et de la BSO sur l'expression de différents gènes du métabolisme oxydatif dans les cellules THP1.**

Niveau d'expression de *NRF2*, *KEAP1*, *BACH1* et des gènes antioxydants (*HMOX1*, *SOD1*, *PRDX1*, *NQO1*, *GCLC* et *GPX3*) dans cellules THP1 exposées à la N-acetyl cystéine (NAC, 100  $\mu$ M) ou à la buthionine sulfoximine (BSO, 500  $\mu$ M) pendant 4 h (a) et 24 h (b) par rapport aux cellules non traitées du temps correspondant (RQ=1) (n=3).

Zone grise : non significatif.

## DISCUSSION

La survie des cellules souches leucémiques au sein de la niche osteoblastique est confortée par l'hypoxie qui y réside, abaissant potentiellement leur niveau d' $H_2O_2$  (Fan *et al.*, 2008) (Skinner *et al.*, 2008) (Hao *et al.*, 2011). De plus, les CSL présenteraient un faible niveau de ROS et le contact des cellules leucémiques avec les CSM provoquerait une diminution du niveau de ROS en augmentant l'expression de *GPX3* dans les cellules leucémiques (Vignon *et al.*, 2010). Le métabolisme oxydatif est donc probablement une composante importante de la physiologie des cellules leucémiques des LAM.

NRF2 est un facteur de transcription provoquant l'expression de plus d'une centaine de gènes dont des enzymes antioxydantes. Il a été montré qu'il est impliqué dans des phénomènes de cancérogénèse, de résistance tumorale et est considéré comme une cible potentielle pour la chimio-prévention et le traitement du cancer.

NRF2 pourrait être impliqué dans le métabolisme oxydatif des cellules leucémiques puisque Rushworth *et al.* ont établi que le taux de NRF2 intra-nucléaire variait suivant le type de LAM. De plus, les cellules ayant un taux élevé de NRF2 intra-nucléaire résisteraient aux bortezomib, un inhibiteur du protéasome, en diminuant rapidement et de façon efficace leur niveau d' $H_2O_2$  du fait de la pré-activation de NRF2 et surtout du déplacement de BACH1, libérant les ARE. De plus, la sensibilité des cellules leucémiques au bortezomib étaient significativement augmentée en inhibant NRF2 (Rushworth *et al.*, 2011).

L'objectif de cette étude était de rechercher si NRF2 participe à la régulation du métabolisme oxydatif dans les cellules leucémiques, en recherchant les effets sur ce facteur de transcription de conditions antioxydante (N-acetyl-cystéine, NAC) et pro-oxydante (buthionine sulfoximine, BSO) dans les cellules de lignées leucémiques KG1a et THP1.

L'exposition de cellules KG1a et THP1 à la NAC ou à la BSO n'a pas modifié la cellularité ni la morphologie cellulaire. La mesure du niveau d' $H_2O_2$  par cytométrie en flux confirme le caractère pro-oxydant de la BSO, avec une augmentation de 19 et 123% pour

KG1a à 4 h et 24 h ; et de 3 et 39% pour THP1. Il n'a pas été mesuré de variation significative du niveau d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 24 h d'exposition à la NAC.

La localisation de NRF2 a été étudiée par western blot et microscopie confocale. Dans les cellules THP1, le stress oxydatif induit par la BSO a entraîné une augmentation du niveau intra-nucléaire de NRF2 suggérée par les western blots et confirmée par microscopie confocale. En outre, il a été observé une surexpression du gène cible *HMOX1*, en faveur d'une fixation de NRF2 sur l'ARE de ce gène. Il est intéressant de noter que la surexpression de ce même gène a été obtenue avec le SFN, un agent connu pour dissocier le complexe NRF2/KEAP1. Si la NAC n'a pas induit de variation détectable par cytométrie en flux du niveau de ROS dans ces cellules, il a toutefois été observé par microscopie confocale que NRF2 quittait le noyau pour se concentrer en intracytoplasmique.

Ces résultats obtenus sur les cellules THP1 ont aussi été retrouvés sur les cellules KG1a. Si la répétition de ces expériences confirme les résultats obtenus, il sera possible de conclure que NRF2 participe à la régulation du stress oxydatif des cellules leucémiques KG1a et THP1.

Le niveau de NRF2 était plus élevé dans le noyau des cellules de leucémie à différenciation monocyttaire (THP1) comparativement aux cellules de leucémie peu différenciée (KG1a). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Rushworth *et al* décrivant un niveau basal élevé de NRF2 dans le noyau des cellules THP1. De plus, la surexpression de *HMOX1* observée avec le SFN est en adéquation avec les études de Ade *et al* (Ade *et al.*, 2009). *HMOX1* code pour l'hème oxygénase 1 (HO1), une enzyme catalysant la dégradation de l'hème en monoxyde de carbone, Fe<sup>2+</sup> et biliverdine. HO1 possède des propriétés cyto-protectives antioxydante, anti-inflammatoire et anti-apoptotique. La transcription de son gène *HMOX1* a été démontrée comme inductible par différents stimuli comme l'irradiation UV, l'oxyde nitrique, les cytokines inflammatoires, les prostaglandines, les métaux lourds et bien sûr les ROS.

Il est intéressant d'observer que nos expériences n'ont pas mis en évidence de surexpression des gènes *SOD1*, *PRDX1* et *GCLC*, d'autres cibles connues de NRF2. Ceci

suggère que la transcription de ces gènes est sous le contrôle d'autres facteurs de transcription en complément de NRF2.

Le stress oxydatif des cellules de la lignée leucémique KG1a comme celui des cellules de leucémie murine induite par *Meis1* et *Hoxa9* étant contrôlé par la GPX3 (Hérault *et al.*, 2010) (Vignon *et al.*, 2010), nous avons quantifié l'expression de *GPX3* dans les mêmes conditions expérimentales et celle-ci n'a pas été modifiée. Ceci suggère que NRF2 participe au contrôle du stress oxydatif indépendamment de la régulation transcriptionnelle par NRF2 du gène *GPX3*. Toutefois, dans une étude transcriptomique de cellules hépatiques des gènes induits par l'activation de NRF2 par le SFN, il a été rapporté une faible surexpression de *GPX3* (Hu *et al.*, 2006).

En conclusion, nous avons montré que NRF2 jouerait un rôle dans la régulation du métabolisme oxydatif dans les cellules leucémiques. Plusieurs études permettront de mieux connaître son importance dans les LAM notamment :

- la recherche de mutations et de différence d'expression de *NRF2* et *KEAP1* dans les leucémies et plus particulièrement dans les CSL *versus* les blastes,
- l'étude du profil antioxydant développé dans l'équipe du Pr Hérault (Hérault et Vignon, Brevet 2010), notamment sa corrélation avec le niveau de NRF2 dans les LAM,
- la comparaison de la localisation subcellulaire et de l'expression de NRF2 dans les CSL *versus* les blastes en utilisant les modèles des leucémies murines Fla2 et F1b1 (Wilhelm *et al.*, 2011).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bibliographie réalisée dans le format de la revue *Nature Medicine*

Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J.-L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M.-H., Bonnet, P.-A., Fabre, I., Ourlin, J.-C. HMOX1 and NQO1 Genes are Upregulated in Response to Contact Sensitizers in Dendritic Cells and THP-1 Cell Line: Role of the Keap1/Nrf2 Pathway. *Toxicol Sci* **107**, 451-460 (2009).

Chan, K., Lu, R., Chang, J.C., Kan, Y.W. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13943-13948 (1996).

Cho, H.-Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P.M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.-Y., Kleeberger, S.R. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 175-182 (2002).

Cumano, A., Godin, I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* **25**, 745-785 (2007).

DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., Scrimieri, F., Winter, J.M., Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S.E., Blair, I.A., Tuveson, D.A. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106-109 (2011).

Estey, E., Dohner, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**, 1894–1907 (2006).

Fan, J., Cai, H., Yang, S., Yan, L., Tan, W. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**, 153-158 (2008).

Hao, Y., Cheng, D., Ma, Y., Zhou, W., Wang, Y. The Relationship Between Oxygen Concentration, Reactive Oxygen Species and the Biological Characteristics of Human Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells. *Transplant Proc* **43**, 2755–2761 (2011).

Herault, O., Hope, J., Deneault, E., Trost, M., Mayotte, N., Chagraoui, J., Wilhem, B., Allot, S., Sauvageau, M., Thibault, P., Sauvageau, G. Gpx3 determines the competitiveness of normal and leukemic stem cells. *Blood* **112**, (n°1587 abst) (2010).

Hérault O, Vignon C. (2010) « Method for Cancer Diagnosis » – Brevet européen déposé le 22 décembre 2010 – n° dépôt INPI : EP 10 306 483.8 (caractérisation à visée diagnostique de l'expression des gènes antioxydants, signature antioxydante dans les hémopathies ou « antioxydogramme »)

Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M.R., Khor, T.O., Gopalkrishnan, A., Lin, W., Reddy, B., Chan, J.Y., Kong, A.N.T. Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett* **243**, 170–192 (2006).

- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., Suda, T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **12**, 446-451 (2006).
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 313-322 (1997).
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., Yamamoto, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13**, 76-86 (1999).
- Jain, A.K. Nuclear Import and Export Signals in Control of Nrf2. *J Biol Chem* **280**, 29158-29168 (2005).
- Jang, Y.Y., Sharkis, S.J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **110**, 3056 (2007).
- Jiang, T., Chen, N., Zhao, F., Wang, X.-J., Kong, B., Zheng, W., Zhang, D.D. High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res* **70**, 5486 - 5496 (2010).
- Jozkowicz, A., Was, H., Dulak, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal* **9**, 2099-2117 (2007).
- Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G., Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2046-2051 (2004).
- Katoh, Y., Ito, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., Yamamoto, M. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* **6**, 857-868 (2001).
- Keller, U. auf dem, Huber, M., Beyer, T.A., Kumin, A., Siemes, C., Braun, S., Bugnon, P., Mitropoulos, V., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Hohl, D., Werner, S. Nrf2 transcription factor in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing. *Mol Cell Biol* **26**, 3773-3784 (2006).
- Khor, T.O., Huang, M.-T., Prawan, A., Liu, Y., Hao, X., Yu, S., Cheung, W.K.L., Chan, J.Y., Reddy, B.S., Yang, C.S., Kong, A.-N. Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **1**, 187 -191 (2008).
- Kim, H.-R., Kim, S., Kim, E.-J., Park, J.-H., Yang, S.-H., Jeong, E.-T., Park, C., Youn, M.-J., So, H.-S., Park, R. Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin. *Lung Cancer* **60**, 47-56 (2008).

- Kim, S.K., Yang, J.W., Kim, M.R., Roh, S.H., Kim, H.G., Lee, K.Y., Jeong, H.G., Kang, K.W. Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Free Radic Biol Med* **45**, 537-546 (2008).
- Kim, Y.R., Oh, J.E., Kim, M.S., Kang, M.R., Park, S.W., Han, J.Y., Eom, H.S., Yoo, N.J., Lee, S.H. Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* **220**, 446-451 (2010).
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., Yamamoto, M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**, 7130-7139 (2004).
- Kuroha, T., Takahashi, S., Komeno, T., Itoh, K., Nagasawa, T., Yamamoto, M. Ablation of Nrf2 function does not increase the erythroid or megakaryocytic cell lineage dysfunction caused by p45 NF-E2 gene disruption. *J Biochem* **123**, 376-379 (1998).
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648 (1994).
- Lee, H.-R., Cho, J.-M., Shin, D.-ha, Yong, C.S., Choi, H.-G., Wakabayashi, N., Kwak, M.-K. Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. *Mol Cell Biochem* **318**, 23-31 (2008).
- Loignon, M., Miao, W., Hu, L., Bier, A., Bismar, T.A., Scrivens, P.J., Mann, K., Basik, M., Bouchard, A., Fiset, P.O., Batist, Z., Batist, G. Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* **8**, 2432 -2440 (2009).
- Mahaffey, C.M., Zhang, H., Rinna, A., Holland, W., Mack, P.C., Forman, H.J. Multidrug-resistant protein-3 gene regulation by the transcription factor Nrf2 in human bronchial epithelial and non-small-cell lung carcinoma. *Free Radic Biol Med* **46**, 1650-1657 (2009).
- Miyazaki, T., Kirino, Y., Takeno, M., Samukawa, S., Hama, M., Tanaka, M., Yamaji, S., Ueda, A., Tomita, N., Fujita, H., Ishigatsubo, Y. Expression of heme oxygenase-1 in human leukemic cells and its regulation by transcriptional repressor Bach1. *Cancer Sci* **101**, 1409-1416 (2010).
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., Kan, Y.W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9926 (1994).
- Motohashi, H., Kimura, M., Fujita, R., Inoue, A., Pan, X., Takayama, M., Katsuoka, F., Aburatani, H., Bresnick, E.H., Yamamoto, M. NF-E2 domination over Nrf2 promotes ROS accumulation and megakaryocytic maturation. *Blood* **115**, 677-686 (2010).
- Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* **374**, 337 (2003).

- Nioi, P., Nguyen, T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 816-821 (2007).
- Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P.J., Pickett, C.B. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **25**, 10895-10906 (2005).
- Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., Suzuki, T., Kobayashi, A., Yokota, J., Sakiyama, T. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* **68**, 1303 (2008).
- Owusu-Ansah, E., Banerjee, U. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* **461**, 537-541 (2009).
- Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yokoyama, S., Yamamoto, M. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* **21**, 689-700 (2006).
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T.W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3410-3415 (2001).
- Rushmore, T.H., Morton, M.R., Pickett, C.B. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* **266**, 11632-11639 (1991).
- Rushworth, S.A., Bowles, K.M., MacEwan, D.J. High basal nuclear levels of Nrf2 in acute myeloid leukemia reduces sensitivity to proteasome inhibitors. *Cancer Res* **71**, 1999-2009 (2011).
- Shibata, T., Kokubu, A., Gotoh, M., Ojima, H., Ohta, T., Yamamoto, M., Hirohashi, S. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology* **135**, 1358-1368, 1368.e1-4 (2008).
- Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., Hirohashi, S. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 13568 - 13573 (2008).
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M.O., Herman, J.G., Baylin, S.B., Sidransky, D., Gabrielson, E., Brock, M.V., Biswal, S. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* **3**, e420 (2006).
- Skinner, A.M., O'Neill, S.L., Grompe, M., Kurre, P. CXCR4 induction in hematopoietic progenitor cells from Fanca<sup>-/-</sup>, -c<sup>-/-</sup>, and -d2<sup>-/-</sup> mice. *Exp Hematol* **36**, 273-282 (2008).
- Stacy, D.R., Ely, K., Massion, P.P., Yarbrough, W.G., Hallahan, D.E., Sekhar, K.R., Freeman, M.L. Increased expression of nuclear factor E2 p45-related factor 2 (NRF2) in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* **28**, 813-818 (2006).

- Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M.M., Yamamoto, M., Igarashi, K. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* **21**, 5216-5224 (2002).
- Sun, Z., Zhang, S., Chan, J.Y., Zhang, D.D. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol* **27**, 6334-6349 (2007).
- Tarumoto, T., Nagai, T., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., Mitsugi, K., Nakano, S., Muroi, K., Komatsu, N., Ozawa, K. Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. *Exp Hematol* **32**, 375-381 (2004).
- Thangasamy, A., Rogge, J., Krishnegowda, N.K., Freeman, J.W., Ammanamanchi, S. Novel function of transcription factor Nrf2 as an inhibitor of RON tyrosine kinase receptor mediated cancer cell invasion. *J Biol Chem* (2011).
- Vignon, C. Contrôle du métabolisme oxydatif des cellules leucémiques par le microenvironnement médullaire. Thèse : Science de la vie, Tours (2011).
- Vignon, C., Georget, M.T., Levem, Y., Ducrocq, E., Bernard, M.C., Estienne, M.H., Kerboeuf, D., Rosset, P., Gyan, E., Binet, C., Domenech, J., Gouilleux, F., Hérault, O. Bone marrow mesenchymal stroma cells regulate the metabolism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human leukemic cells. *Blood* **112**, (n°1058 abst) (2010).
- Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D., Yamamoto, M. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* **35**, 238-245 (2003).
- Wakabayashi, N., Shin, S., Slocum, S.L., Agoston, E.S., Wakabayashi, J., Kwak, M.-K., Misra, V., Biswal, S., Yamamoto, M., Kensler, T.W. Regulation of notch1 signaling by nrf2: implications for tissue regeneration. *Sci Signal* **3**, ra52 (2010).
- Wang, R., An, J., Ji, F., Jiao, H., Sun, H., Zhou, D. Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 151-154 (2008).
- Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., Wong, P.K., Zhang, D.D. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **29**, 1235-1243 (2008).
- Wilhelm, B.T., Briau, M., Austin, P., Faubert, A., Boucher, G., Chagnon, P., Hope, K., Girard, S., Mayotte, N., Landry, J.R., Hébert, J., Sauvageau, G. RNA-seq analysis of 2 closely related leukemia clones that differ in their self-renewal capacity. *Blood* **117**, e27 (2011).

Xu, C., Huang, M.-T., Shen, G., Yuan, X., Lin, W., Khor, T.O., Conney, A.H., Kong, A.-N.T. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by Nuclear Factor E2-Related Factor 2. *Cancer Res* **66**, 8293 -8296 (2006).

You, A., Nam, C.-W., Wakabayashi, N., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Kwak, M.-K. Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2. *Arch Biochem Biophys* **507**, 356-364 (2011).

Zhang, D.D., Lo, S.C., Cross, J.V., Templeton, D.J., Hannink, M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* **24**, 10941 (2004).

Zhang, D.D., Hannink, M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* **23**, 8137-8151 (2003).

# SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,  
de mes chers condisciples  
et selon la tradition d'Hippocrate,  
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur  
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,  
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux  
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira  
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas  
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,  
je rendrai à leurs enfants  
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime  
si je suis fidèle à mes promesses.  
Que je sois couvert d'opprobre  
et méprisé de mes confrères  
si j'y manque.