

SOMMAIRE

1. RESUME	5
2. LISTE DES ABREVIATIONS	6
3. TABLE DES FIGURES	7
4. LISTE DES TABLEUX	8
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE :	9
1. INTRODUCTION	9
2. CANCER DU FOIE	10
3. PATHOLOGIE CANCÉREUSE	12
3.1. Cancer primitif.	13
3.2. Métastases du foie.	13
4. TYPES DE CANCER DU FOIE	13
4.1. Tumeurs bénignes.	13
4.2. Tumeurs malignes.	14
5. DIAGNOSTIQUE	14
6. TRAITEMENT	15
7. PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES DU SORAFENIB	16
7.1. Mécanisme d'action et effets pharmacodynamiques.	16
7.2. Angiogenèse.	17
MATERIELS ET METHODES	18
1. CULTURE CELLULAIRE	18
1.1. Préparation de milieu de culture.....	18
1.2. Préparation de la culture cellulaire.	18
1.3. Trypsination.....	19
2. DENOMBREMENT DES RESULTATS	19
3. TRAITEMENT ET RECOLTE DES CELLULES	19
4. DETECTION DES PROTEINES CARBONYLEES (OXYBLOT)	20
5. DETECTION DE S-NITROSYLATION DES PROTEINES PAR BIOTIN SWITCH	20
5.1. Détection de protéines biotinylées par SDS-PAGE.	21
5.2. Purification des protéines biotinylées.	21
6. DETECTION DE LA PROTEINE TYROSINE NITRATION	22

7. QUANTIFICATION DES PROTEINES.	22
8. WESTERN BLOT.	22
8.1. Électrophorèse de protéine sur gel de bi-acrylamide (SDS-page).	22
8.2. Transfert et immuno-détection (Western-blot) de protéines avec phosphatase alcaline ou PEROXYDASE.	23
8.3. β -actine.	24
8.4. Révélation par chimiluminescence.	25
9. COUPES HISTOLOGIQUES AU MICROTOME.	26
10. COUPES HISTOLOGIQUES AU CRIOSTATE.	26
RESULTATS ET DISCUSSIONS:	27
1. Résultats des quantifications des protéines.	27
Détection des protéines biotinilées (Biotin-Switch) :	29
Caspase-8 :	30
Détection de Nitration en Tyrosine :	32
Détection des protéines carbonylées (kit Oxiblot) :	34
CONCLUSION	36
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	37
ANNEXE	38
1. Présentation de l'Institut de biomédecine de Séville IBIS.	39
Présentation de l'IBIS:	39
Mission :	39
Vision :	39
2. Sujet de recherche.	40
• Caractérisation génétique et fonctionnelle de cancer du pancréas. Les modèles cliniques et expérimentales.	40
• Mort/prolifération cellulaire dans le carcinome hépatocellulaire.	40
• Régénération hépatique par injection de cellules souches dans le foie. Les modèles cliniques et expérimentales.	40
Chercheur Responsable:	40
4. Kit Oxyblotc S7150.	41
5. Réactifs de l'électrophorèse.	41
6. Réactifs du transfert sur membrane.	46

1. Résumé

L'hépatocarcinome représente la cinquième tumeur la plus fréquente et la troisième cause de mortalité liée au cancer. L'administration de doses élevées d'oxyde nitrique (NO) favorise la mort des cellules hépatiques. Le NO contribue à la signalisation cellulaire en induisant des modifications post-traductionnelles oxydative/nitrosative dépendantes.

Le but de la présente étude était d'étudier les modifications de protéines et leurs relations avec la prolifération et la mort cellulaire dans les cellules d'hépatome. Etude de l'augmentation de la production de NO intracellulaire a été réalisée par une étude de la surexpression de l'oxyde nitrique synthase-3 (NOS-3) dans les cellules HepG2. Nous avons aussi évalué le modèle de nitration, nitrosylation et carbonylation des protéines par analyse protéomique.

Les résultats ont montré que la surexpression NOS-3 cellulaire augmente le stress oxydatif, qui a touché essentiellement des protéines impliquées dans le repliement des protéines de la cellule. La carbonylation également modifié le métabolisme, ainsi que les réponses immunitaires et anti-oxydantes. L'interaction du stress oxydatif/ nitrosatif génère la nitration de la tyrosine, qui a touché le marqueur tumoral Serpine B3, synthèse de l'ATP et du cytosquelette. Tous ces effets ont été associés à une diminution de l'activité de chaperon, une diminution de la prolifération cellulaire et une mort cellulaire accrue.

Les études du laboratoire ont montré que le changement de la nitration, nitrosation et carbonylation des protéines par le stress oxydatif /nitrosatif dépendant de NO a été liée à une diminution de la survie des cellules dans une lignée cellulaire d'hépatome.

En parallèle, des recherches sur les effets, non décrits, du sorafénib, notamment son effet sur les modifications post-traductionnelles ont été effectués sur des différentes lignées hépatiques (HepG2, Hep3b et Huh7). Ces recherches ont démontré que le sorafénib possède également une propriété anti-tumorale qui se manifeste par augmentation de la mortalité des cellules tumorales par activation de l'apoptose. Cette étude a été conclue par une élaboration d'une thérapie anti-tumorale combinée par NO et sorafénib.

2. Liste des abréviations.

HNF = L'hyperplasie nodulaire focale.

CHC = carcinome hépatocellulaire.

SHNA = stéatohépatite non alcoolique.

AFP = Alpha-foetoprotéine (AFP).

TDM= tomodensitométrie.

IRM= imagerie par résonance magnétique.

NO= oxyde nitrique.

NOS-3= oxyde nitrique synthéase-3.

SDS= sodium dodécyl sulfate.

DDT=Le dithiothréitol.

BSA= Bovine Sérum Albumine

FBS = Fœtal Bovine sérum

3. Table des figures.

Figure 1. La circulation du sang et de la bile dans le foie (INC, 2011).

Figure 2. La segmentation du foie selon Couinaud (1957).

Figure 3. Coupe de foie présentant un carcinome hépatocellulaire avec une capsule fibreuse et une forme nodulaire (Schneider et al., 2006).

Figure 4. Les cibles du sorafénib pour diminuer la prolifération tumorale. Wilhelm SM, 2004.

Figure 5. Mécanisme de l'angiogenèse et relation avec VEGF et cancer. Folkman, N 1971.

Figure 6. Photos du logiciel UVP utilisé en chimiluminescence. Photos prise par moi au sein de l'Ibis, salle des grands appareils. (Photos permises).

Figure 7. Photo d'un microtome. Ibis laboratoire d'histologie et de microscopie 2^{ème} étage.

4. Liste des tableaux.

Tableau 1 : Résultats du spectrophotomètre pour CASPASE-8 et OXIBLOT.

Tableau 2 : Résultats du spectrophotomètre pour Biotin switch.

Tableau 3 : Résultats du spectrophotomètre pour la Tyrosine.

Tableau 4 : Préparation de 400 ml 4X SEPARATING.

Tableau 5 : Préparation de 200 ml 4X STACKING.

Tableau 6 : Préparation de 3000 ml 10XRUNNING BUFFER

Tableau 7 : Préparation de 10 ml 1XAPS.

Tableau 8 : Préparation de 10 ml 5XLB.

Tableau 9 : Préparation de 100 ml 1x.

Tableau 10 : Volumes pour 4 gels gels de mini-Protean (BioRad) SEPARATING.

Tableau 11 : Volumes pour 4 gels gels de mini-Protean (BioRad) STACKING.

Tableau 12 : Volumes pour 2 gels gels de mini-Protean (BioRad) Separating.

Tableau 13 : Volumes pour 2 gels gels de mini-Protean (BioRad) Stacking.

Tableau 14 : Préparation de 1000 ml 1X Tampon de transfert.

Tableau 15 :Préparation de 3L ml 10XTampon PBS.

Tableau 16 :Préparation de 1000 ml 1X Tampon PBS-T.

Tableau 17 : Préparation de 200 ml 1XSolution de blocage.

Tableau 18 : Solution de dilution anticorps. Préparation de 50 ml 1X.

Tableau 19 : Préparation de 500 ml 1X de Stipping.

Revue Bibliographique :

1. INTRODUCTION.

Le foie fait partie de l'appareil digestif, c'est l'un des organes les plus volumineux du corps. Il s'étend en longueur sur une vingtaine de centimètres. On peut le repérer en mettant sa main sur la droite de l'abdomen, sous les dernières côtes. Il est composé de deux parties appelées lobes : un lobe droit volumineux et un lobe gauche plus petit.

Le foie possède de nombreuses fonctions indispensables à l'organisme. Il produit la bile qui aide à la digestion des graisses. Un réseau de voies biliaires parcourt le foie, collecte la bile fabriquée et la transporte jusqu'à la vésicule biliaire. Cette petite poche, attachée au foie, stocke la bile et la libère dans les intestins, lors des repas, par le canal cholédoque. En plus, il stocke le glucose, les vitamines et les minéraux issus de la digestion et qui lui sont amenés par le sang de la veine porte hépatique. Il les libère dans le sang lorsque le corps en a besoin. Il est considéré comme usine des protéines qui contribuent à la coagulation du sang afin de stopper les saignements en cas de coupure ou de blessure. Il débarrasse le sang des éléments nocifs comme les résidus de médicaments et les déchets de l'organisme. Et enfin, il est responsable de la régulation de la quantité de certaines substances chimiques naturellement présentes dans le corps comme le cholestérol (INC, 2011).

Le foie possède également d'importantes capacités de régénération puisque si l'on retire une partie du foie, de nouvelles cellules se fabriquent rapidement et permettent au foie restant de grossir et de retrouver la taille d'un foie entier. Un quart du volume du foie seulement est nécessaire pour faire fonctionner le corps normalement.

Le foie est alimenté par deux gros vaisseaux sanguins : la veine porte et l'artère hépatique. Le sang drainé par la veine porte provient de l'œsophage, de l'estomac et des intestins. La veine porte amène ainsi au foie un sang pauvre en oxygène mais riche en nutriments. L'artère hépatique provient du cœur et apporte au foie un sang riche en oxygène.

Ces deux vaisseaux, en entrant dans le foie, se divisent en plusieurs branches pour en alimenter les différentes parties. On appelle « segment » une partie du foie qui est alimentée par une branche de la veine porte hépatique et une branche de l'artère hépatique.

Après avoir irrigué l'ensemble des cellules du foie, le sang est évacué par la veine hépatique, qui se jette ensuite dans la veine cave inférieure qui retourne au cœur.

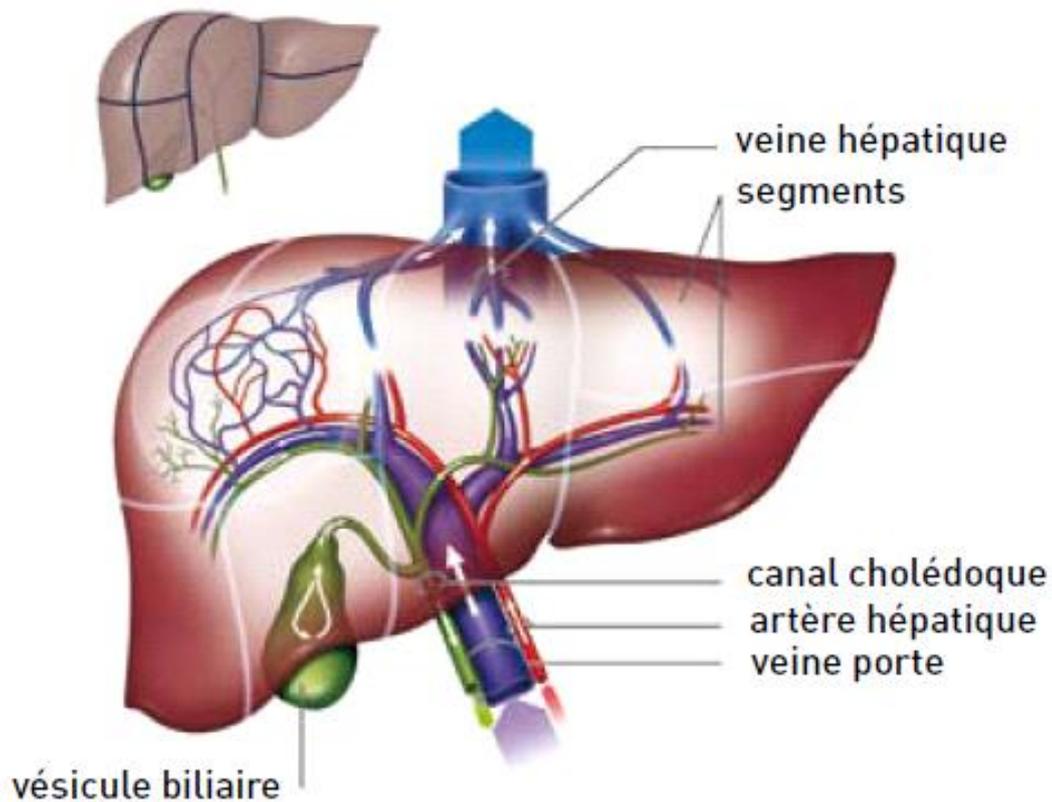


Figure 1. La circulation du sang et de la bile dans le foie (INC, 2011).

2. CANCER DU FOIE.

Le foie est composé essentiellement de cellules appelées hépatocytes qui s'organisent en petits groupes, les lobules, autour d'une veine centrale. Dans 90 % des cas, le cancer primitif du foie se développe à partir des hépatocytes. On parle de carcinome hépatocellulaire (CHC) ou d'hépatocarcinome. D'autres formes plus rares de cancers primitifs du foie peuvent se développer à partir des cellules des canaux biliaires (cholangiocarcinome) ou beaucoup plus rarement, des vaisseaux sanguins (hémangioendothéliome épithélioïde).

Un cancer du foie survient lorsque des cellules du foie, initialement normales, se transforment et se multiplient de façon anarchique jusqu'à former une tumeur maligne.

La segmentation du foie est de 4 zones anatomiques appelées lobes, elle se base sur des caractéristiques de forme externe du foie. Cependant, une autre segmentation existe, ces travaux ont fondé les bases de la chirurgie hépatobiliaire moderne, permettant notamment l'introduction et le développement des hépatectomies (Couinaud et al., 1957).

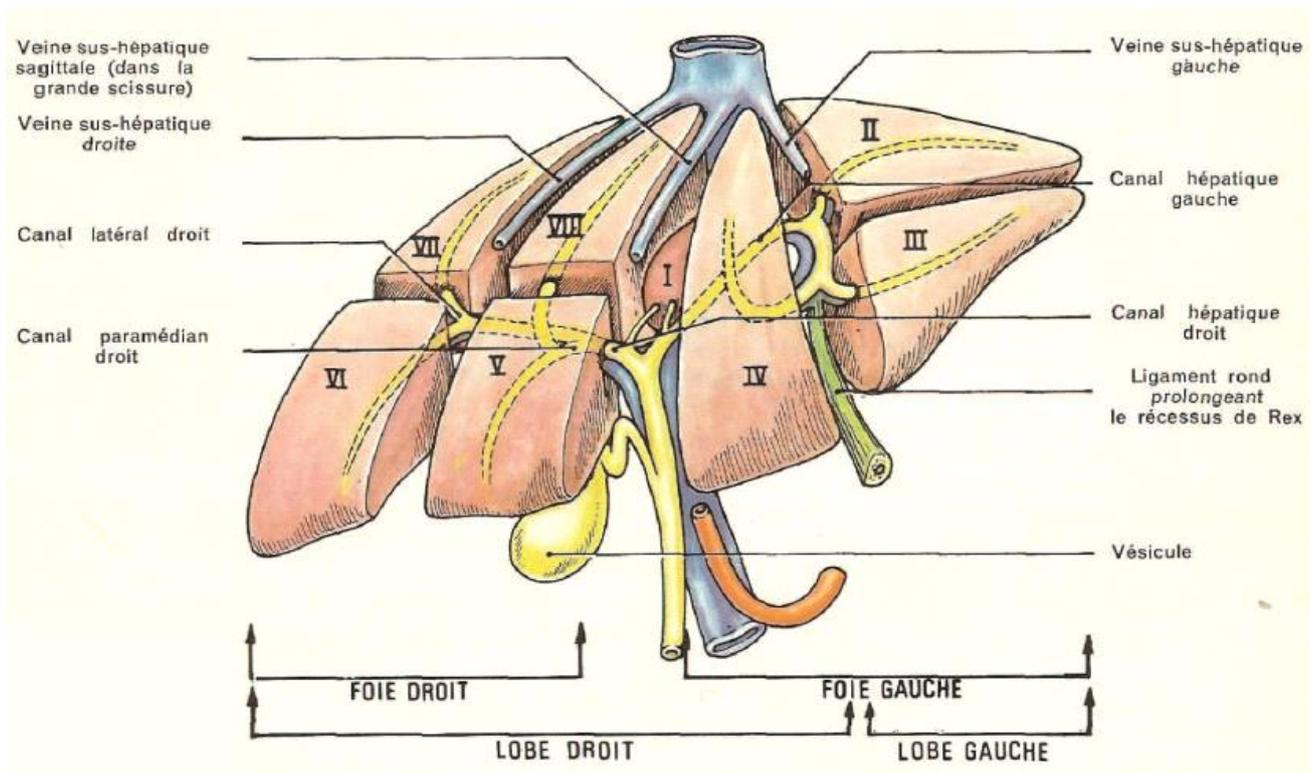


Figure 2. La segmentation du foie selon Couinaud (1957).

Plusieurs facteurs jouent un rôle dans le développement du cancer (FCF, 2012). Comme le foie filtre le sang de toutes les parties du corps, les cellules cancéreuses d'ailleurs peuvent se loger dans le foie et commencer à croître. Les cancers qui commencent dans l'intestin se propagent souvent du foie. La capacité du foie de se régénérer peut aussi être liée au développement de cancers du foie.

Les chercheurs ont identifié plusieurs facteurs de risque qui rendent les gens plus susceptibles de développer un cancer du foie. Parmi les personnes atteintes d'une maladie chronique du foie, les hommes sont plus susceptibles de développer un cancer du foie que les femmes. La raison en est inconnue.

Infection virale du foie : Une infection chronique, hépatite B ou hépatite C, peut entraîner le développement d'un cancer. Certains types de maladies du foie héréditaires comme l'hémochromatose qui résulte en une accumulation excessive de fer dans le foie, ainsi que la déficience en alpha-1 antitrypsine, et la tyrosinémie peuvent entraîner le développement d'un cancer du foie plus tard durant la vie.

Cirrhose : la formation de tissu cicatriciel dans le foie ou cirrhose peut souvent entraîner un cancer. Les causes principales de la cirrhose du foie sont la consommation d'alcool, l'hépatite B et l'hépatite C chroniques et la stéatohépatite non alcoolique (SHNA).

Alcool : une utilisation excessive d'alcool est un facteur de risque connu pour le développement de la cirrhose alcoolique et du cancer du foie.

Obésité : la stéatose hépatique est liée à l'obésité et peut augmenter le risque de développer un cancer du foie.

Tabagisme : peut augmenter le risque de cancer du foie si vous êtes déjà atteint d'une maladie chronique du foie.

Stéroïdes anabolisants : une utilisation à long terme des stéroïdes anabolisants peut augmenter le risque d'un cancer du foie.

3. PATHOLOGIE CANCÉREUSE.

L'hépatocarcinogénèse décrit le processus de développement et d'évolution d'une lésion bénigne vers un carcinome hépatocellulaire de haut grade. En effet, le développement d'un CHC dans le foie peut être vu comme un processus à plusieurs étapes, induites par une variété d'événements. Les cirrhoses par exemple, peuvent stimuler les cellules du foie à se diviser entraînant une sensibilité à la carcinogénèse. Cependant, le CHC peut également se produire en l'absence de cirrhose, mais avec une plus faible probabilité. Le développement de nodules régénératifs est ainsi une des premières étapes de la formation d'une lésion cancéreuse. Un nodule régénératif est une zone bien sphérique de tissu montrant un élargissement en réponse à une circulation altérée. C'est une lésion bénigne, mais qui va favoriser la création de cellules dégénérantes, pouvant entraîner une dysplasie (altération de l'architecture et de la fonction d'un tissu.), puis à un cancer hépatique (Esneault, 2009).



Figure 3. Coupe de foie présentant un carcinome hépatocellulaire avec une capsule fibreuse et une forme nodulaire (Schneider et al., 2006)

3.1. Cancer primitif.

Le cancer du foie est la croissance et la propagation de cellules anormales dans le foie. Un cancer primitif du foie désigne une tumeur maligne qui s'est développée à partir des cellules du foie.

3.2. Métastases du foie.

Le foie peut également être atteint par des métastases, c'est-à-dire des tumeurs formées de cellules cancéreuses qui se sont détachées d'une tumeur située ailleurs dans l'organisme (par exemple dans le côlon ou le sein).

Les symptômes du cancer du foie, aux premiers stades, n'entraîne pas de symptômes. Au stade avancé de la maladie, un patient peut présenter une perte de poids, perte d'appétit, douleur abdominale, jaunisse et apparition de liquide dans l'abdomen. Les traitements du cancer primitif du foie et des métastases hépatiques sont complètement différents.

4. TYPES DE CANCER DU FOIE.

En l'absence d'une maladie du foie chronique, le cancer du foie est rare. Cependant, chez les patients atteints d'une maladie du foie sous-jacente, le cancer du foie peut être assez courant. La cause exacte du cancer du foie est inconnue. Il existe plusieurs types de tumeurs du foie, seulement quelques-unes sont cancéreuses. La classification la plus importante est de déterminer si les tumeurs sont bénignes (relativement sans danger) ou malignes (capables de se propager à partir du foie et par conséquent plus graves).

Le cancer du foie peut aussi se développer à plus d'un site dans le foie et peut croître en tumeurs multiples. Ce profil est le plus souvent observé chez les personnes atteintes de cirrhose du foie.

4.1. Tumeurs bénignes.

L'hémangiome est le type le plus courant de tumeur bénigne du foie. Il s'agit d'une croissance anormale des vaisseaux sanguins dans le foie qui commence dans le fœtus. Plus de 10 % de la population normale a des hémangiomes dans le foie (FCF, 2012). La plupart des gens ayant des hémangiomes ne présentent aucun symptôme et ne requièrent aucun traitement. Dans des cas rares, certains hémangiomes peuvent augmenter de volume et saigner, et le cas échéant, ils peuvent nécessiter une intervention chirurgicale pour les enlever.

Les **adénomes hépatiques** sont des tumeurs bénignes des cellules hépatiques.

La plupart n'entraînent pas de symptômes et ne requièrent pas de traitement. Les adénomes hépatiques surviennent plus souvent chez les femmes et semblent être déclenchés dans certains cas par les contraceptifs oraux ou par la grossesse.

L'**hyperplasie nodulaire focale (HNF)** est une excroissance de plusieurs types de cellules ressemblant à une tumeur. Bien que les tumeurs HNF soient bénignes, il peut être difficile de les distinguer des cancers du foie.

4.2. Tumeurs malignes.

La forme la plus fréquente du cancer primaire du foie (un cancer qui commence dans le foie) chez les adultes s'appelle carcinome hépatocellulaire (CHC). Il s'agit d'un cancer des cellules hépatiques. Ce type de cancer peut présenter différents profils de croissance. Certains débutent sous forme d'une seule tumeur qui augmente de volume qui peut éventuellement se propager à d'autres parties du foie.

Le cholangiome est un autre cancer du foie qui prend son origine dans les petites voies biliaires (les canaux qui transportent la bile vers la vésicule biliaire).

Cependant, le plus souvent, lorsque le cancer est présent dans le foie, il n'a pas commencé là mais s'est propagé vers le foie à partir d'un cancer qui a commencé ailleurs dans le corps. Ces types de cancers sont nommés d'après l'endroit où ils ont commencé (site primaire) et sont considérés comme des cancers secondaires du foie ou métastases cancéreuses. Par exemple, un cancer qui a commencé dans les poumons et qui s'est propagé vers le foie s'appelle cancer pulmonaire métastatique avec propagation vers le foie. Les cancers secondaires du foie sont 30 fois plus prévalent que les cancers primaires du foie.

5. DIAGNOSTIQUE.

Le cancer du foie peut être diagnostiqué par un examen physique ou par des examens d'imagerie échographie. Afin de confirmer un diagnostic de cancer du foie, les médecins peuvent réaliser des analyses sanguines pour vérifier une augmentation des taux d'alpha-foetoprotéine (AFP), des examens par ultrasons, des examens par tomodensitométrie (TDM), une imagerie par résonance magnétique (IRM), et des angiogrammes. Et dans certains cas réaliser une biopsie hépatique. Pendant une biopsie, on prélève un petit morceau de foie qui sera étudié en laboratoire (ALF, 2009).

6. TRAITEMENT.

Le traitement du CHC dépend du stade et de la rapidité de croissance de la tumeur. Les petits cancers primaires du foie sont curables. Les taux de guérison diminuent en général à mesure que le volume de la tumeur augmente. Le traitement du cancer du foie peut inclure la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie ou une greffe du foie.

Grefe : Si le cancer ne s'est pas propagé et que le reste du foie est, une greffe de foie (remplacement du foie) peut être une option chez certains patients.

Chirurgie : La chirurgie permet d'enlever les petites tumeurs du foie par un processus appelé résection au cours de laquelle un morceau du foie contenant la tumeur est enlevé. Si le cancer en entier peut être enlevé, un patient a une bonne perspective de survie. Si le cancer est trop volumineux, présent dans plusieurs parties différentes du foie, ou s'est disséminé au-delà du foie, il peut être impossible de l'enlever complètement. Pour plusieurs personnes atteintes d'une cirrhose, il n'y a pas assez de foie sain pour permettre l'enlèvement même d'une petite partie du foie. Dans ce cas, la chirurgie n'est pas une option.

Ablation ou embolisation de la tumeur : L'ablation traite à des méthodes qui détruisent la tumeur sans l'enlever. Des exemples incluent la destruction de la tumeur par radiofréquence, la congélation à l'aide d'une sonde métallique très froide ou l'injection d'alcool directement dans la tumeur pour tuer les cellules cancéreuses. L'apport sanguin vers le cancer peut être diminué en bloquant l'artère qui nourrit le cancer ou en injectant des substances qui obstruent l'artère. C'est ce qu'on appelle embolisation. Comme ce genre de traitement diminue aussi l'apport sanguin vers les tissus hépatiques sains, il peut être dangereux pour les personnes atteintes de maladies comme l'hépatite ou la cirrhose. La chimio-embolisation est la combinaison de l'embolisation et de la chimiothérapie. La chimio-embolisation prolonge la vie des patients chez qui une guérison est impossible.

Injection d'éthanol : De l'éthanol est directement injecté dans la tumeur hépatique pour détruire les cellules cancéreuses.

Radiothérapie : le traitement qui utilise des rayons de haute énergie (comme les rayons X) pour tuer ou rapetisser les cellules cancéreuses. Ce type de traitement peut être utilisé pour rapetisser une tumeur hépatique ou pour soulager les symptômes mais il ne guérit pas le cancer du foie.

Chimiothérapie : a trait à l'utilisation de drogues pour tuer les cellules cancéreuses. Habituellement les drogues sont administrées par voie intraveineuse ou par la bouche. Malheureusement, le cancer du foie ne répond pas bien à la plupart des drogues utilisées en chimiothérapie.

Sorafénib (Nexavar) : Le Sorafénib est un médicament oral utilisé dans les cas avancés de carcinome hépatocellulaire (le type le plus courant de cancer primitif du foie). Nexavar est utilisé dans le traitement du cancer du foie (carcinome hépatocellulaire) et dans le traitement du cancer du rein (carcinome rénal avancé). Nexavar est également dénommé inhibiteur multikinase, ayant démontré *in vitro* et *in vivo* des propriétés à la fois anti-prolifératives et anti-angiogéniques. Il agit en ralentissant la vitesse de croissance des cellules cancéreuses et en bloquant l'apport en sang nécessaire à la croissance des cellules cancéreuses (Wilhelm et al., 2004).

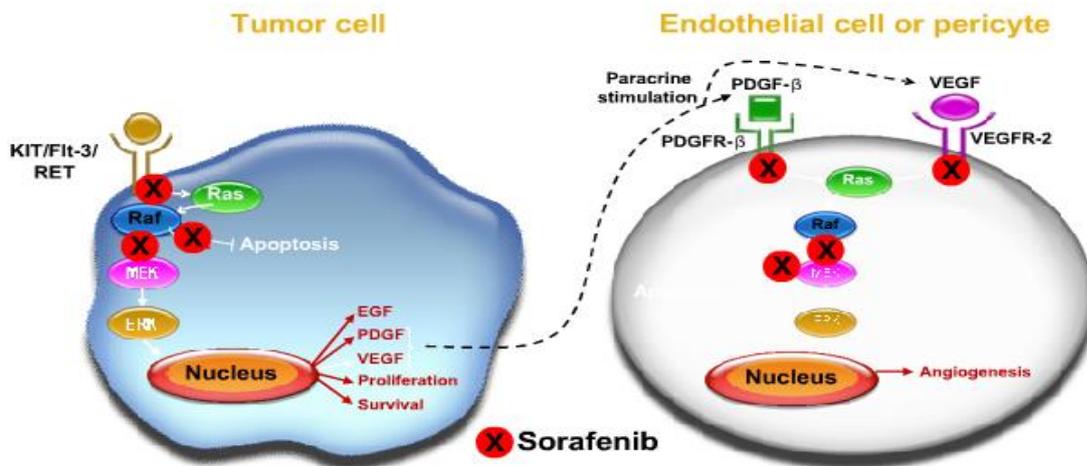
7. PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES DU SORAFENIB.

Le sorafénide est considéré comme un agent pharmacothérapeutique antinéoplasiques et inhibiteurs de protéine kinase. En effet, le sorafénib est un inhibiteur multikinase ayant démontré *in vitro* et *in vivo* des propriétés à la fois anti-prolifératives et anti-angiogéniques.

7.1. Mécanisme d'action et effets pharmacodynamiques.

Le sorafénib est un inhibiteur multikinase qui diminue la prolifération des cellules tumorales *in vitro*. Il inhibe la croissance tumorale d'un large spectre de xénogreffes tumorales humaines chez la souris athymique, accompagnée d'une diminution de l'angiogénèse tumorale. Le sorafénib inhibe l'activité des cibles présentes dans les cellules tumorales (CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT, et FLT-3) et la vascularisation tumorale (CRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, et PDGFR- β). Les RAF kinases sont des sérine/thréonine kinases, alors que les c-KIT, FLT-3, VEGFR-2, VEGFR-3, et PDGFR- β sont des récepteurs tyrosine kinase.

Cibles du sorafenib



Wilhelm SM, et al. Cancer Res 2004

Figure 4: Les cibles du sorafénib pour diminuer la prolifération tumorale. (Wilhelm,2004).

7.2. Angiogenèse.

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique normal, que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire. Mais c'est aussi un processus pathologique, primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases (Folkman et al., 1971).

Angiogenèse, VEGF et cancer

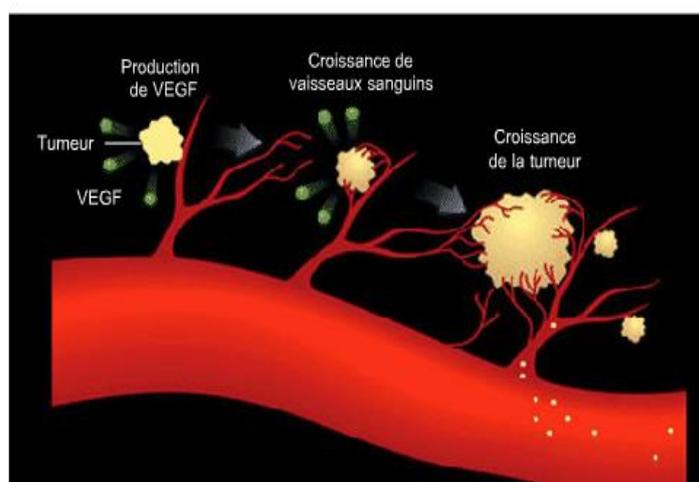


Figure 5: Mécanisme de l'angiogenèse et relation avec VEGF et cancer. Folkman et al., 1971.

MATERIELS ET METHODES.

1. CULTURE CELLULAIRE.

La culture cellulaire est un ensemble de techniques de biologie utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme (*ex-vivo*) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation *in vitro*.

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division (entretien *in vitro* par repiquages successifs). Il s'agit en général de cellules cancéreuses, cellules prélevées sur une tumeur au départ, ou cellules rendues immortelles par traitement mutagène chimique ou physique ou par utilisation de virus oncogènes.

Ce travail a été réalisé sur des cultures cellulaires de 3 lignées hépatocytaires initialement tumorales, prélevées d'une tumeur du Rat. Ces trois lignées sont HepG2, Hep3b et Huh7.

1.1. Préparation de milieu de culture.

Les milieux de culture doivent reproduire aussi fidèlement que possible les conditions de l'environnement que les cellules trouvaient *in vivo*. Ils doivent donc être à la fois un vecteur d'éléments nutritifs, contribuer au maintien des conditions physico-chimiques telles que pH et l'osmolarité et permettre la prolifération des cellules (divisions cellulaires).

La préparation de milieu de culture cellulaire est réalisé à base 435 ml de MEM (Milieu Essentiel Minimum), un milieu synthétique de base commercialisé 50ml de FBS (Fœtal Bovine Serum) 4.5 g/l (Sigma-Aldrich), 5 ml de pyruvate de sodium (100 mM), 5 ml pénicilline et streptomycine 50mg/ml, 5 ml acides aminés essentiel (100mg/ml).

1.2. Préparation de la culture cellulaire.

Des cellules cancéreuse ont été ajouté au milieu de culture (5 ml) à fin de préparer des monocouches cellulaire dans de flacon de 25 cm². Cela a été facilité par un changement périodique de milieu de culture sous une hotte de flux laminaire. Une fois la confluence est atteinte (60 à 70%) il est nécessaire de procéder au trypsination pour limiter cette confluence.

1.3. Trypsination.

Lorsque le tapis de culture (ou monocouche) arrive à confluence, il faut décoller les cellules du support, les disperser et les réensemencer à une densité plus faible dans un nouveau récipient de culture. Cette opération est appelée repiquage. La dispersion des cellules peut être réalisée par grattage du tapis, ou plus classiquement par utilisation d'un mélange de trypsine et d'EDTA (dans ce dernier cas on parle de trypsination).

La trypsination consistait à mélanger de la trypsine + PBS sans calcium dans un tube de 0,5 ml de trypsine EDTA 0,53 mM et 4,5ml de PBS sans calcium pour chaque flacon. Le milieu est retiré et après suivi d'un lavage par PBS sans calcium (5ml). La trypsine/PBS a été ajouté et incubé 5 min dans l'étuve à 37 °C, ensuite homogénéiser. Les cellules sont finalement récupérer et détacher dans des tubes de 50 ml, remplir jusqu'à 50 ml avec du milieu de culture, ensuite centrifuger à 200 g pendant 5 min à 4 °C. Après centrifugation, le culot composés de cellules est dissolu dans 20ml de milieu de culture et homogénéiser.

2. DENOMBREMENT DES RESULTATS.

Dans des tubes ependorfs stériles contenant 20ul de la suspension cellulaire on ajoute 20 ul du bleu de trypan (0,4%), qui favorise le contraste et colore les cellules mortes en bleu et les cellules vivantes restent blanches. Le comptage des cellules (nombre de cellules par ml) est réalisé au microscope inversé sur des lames de Malassez.

3. TRAITEMENT ET RECOLTE DES CELLULES.

Les cellules soumise à la trypsination ont été ajouté par un traitement de sorafénib (10mM) par plaque. La récolte des cellules se fait après 12 heures d'incubation avec le traitement.

Le traitement avec l'oxiblot est réalisé après lavages des cellules par PBS avec calcium, l'ajout de 0,5ml de tampon RIPA, homogénéisation, et récupération des cellules par centrifugation pendant 15 minutes à 10 000 g et 4C°.

Pour la caspase et la tyrosine, elle consiste à retirer le milieu de culture, lavage par PBS avec calcium, et l'ajout de 1 ml de solution de Lyse (pendant 3 à 4 minutes), homogénéisation, et centrifugation à fin de récupérer les cellules.

Pour Biotin: ce traitement a été réalisé selon les recommandations pour la détection de S-nitrosylation par Biotin switch.

4. DETECTION DES PROTEINES CARBONYLEES (OXYBLOT).

Les cellules (1×10^8) ou de tissus (50 mg) se lavent dans du PBS et s'homogénéisent dans 0,5 ml de tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,1% de NP-40, 0,1% de SDS, et les inhibiteurs de protéase de routine), les échantillons sont conservés 15 minutes dans la glace. Centrifugé à 10000 g 4°C pendant 15 min, le surnageant est recueilli. Une quantification des protéines est réalisée. Les protéines carbonylées sont évaluées en utilisant l'essai commercial Oxyblot Protein kit de détection de l'oxydation (Chemicon International, USA). Les échantillons (10 μg de protéine) sont dérivées avec du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), qui réagit avec les groupes carbonyles des protéines, les protéines dérivées avec du 2,4-dinitrophénol (DNP) sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE en utilisant l'anticorps primaire anti-DNP commerciale, avec une dilution (1:250). A lors que les échantillons qui n'ont pas été dérivés avec du DNPH sont utilisés comme contrôle négatif.

5. DETECTION DE S-NITROSYLATION DES PROTEINES PAR BIOTIN SWITCH.

Les cellules (1×10^8) ou de tissus (50 mg) sont lavées dans du PBS et homogénéisées dans 0,5 ml de solution de lyse SNO no-dénaturante (50 mmol / L Tris-HCl, pH 7,4, à 300 mmol / L de NaCl, 5 mmol / l d'EDTA, 0,1 mol / L Neocuproine, 1% de Triton X-100 et des inhibiteurs de protéase de routine). Les échantillons sont conservés 15 minutes dans la glace. Centrifugés à 10000 g 4°C pendant 15 min, le surnageant est recueilli. Les protéines sont évaluées et ajustées à 0,5 mg / ml avec une solution de lyse. Après homogénéisation du lysat ou du tissu cellulaire, on ajoute 4 volumes (4 fois le volume de l'échantillon) de solution de blocage déjà préparée (225 mM HEPES, pH 7.7, 0.9 mM EDTA, 90 μM neocuproine, 2.5% SDS, 20 mmol/L methyl methane thiosulfonate) à 50°C pendant 20 minutes en ragitant de temps en temps ou en permanence, (on utilise un agitateur chauffé), l'excès de méthyle méthane thiosulfonate est éliminé par précipitation avec 2 volumes (double du volume de l'échantillon) d'acétone (-20°C), les échantillons sont laissés 10 min à -20°C . Les échantillons sont centrifugés à 2000 g à 4°C pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est mis à sécher, puis sont remis en suspension dans 0,1 ml de solution de HENS buffer (250 mM d'HEPES, pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproine, SDS 1%) pour chaque milligramme de protéine initial utilisé pour le processus. Les nitrosothiols sont réduites à des thiols avec 1/100 volume de 100 mM (1 mmol / L final) d'acide ascorbique (groupes méthylés inchangés) et avec 1/3 de volume d'environ 4 mM de biotine-N-[6 - (biotinamide)-hexyl]-1'-(2'-pyridyldithio) propionamide (PSPM

dans du N, N-diméthylformamide (DMF) (qui biotinyalise les nouveaux groupements thiols formés) à 25 ° C pendant 1 heure.

Afin d'identifier les niveaux de biotine endogène, chaque échantillon a été divisé en deux: un qui contient du HPDP et un autre avec le même volume de DMF. Les échantillons sont précipités avec 2 volumes d'acétone (-20 ° C) laissés 10 min à -20 ° C, puis sont centrifugés à 2000 g à 4 ° C pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est mis à sécher. Les échantillons sont remis en suspension dans 0,1 ml de tampon HENS buffer (250 mM d'HEPES, pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproïne, SDS 1%) par milligramme de protéine initial utilisé pour le processus.

5.1. Détection de protéines biotinyalées par SDS-PAGE.

La détection est faite avec de la streptavidine-HRP, ou avec un anticorps primaire anti-biotine au cours du blot, car le complexe biotine-HPDP est clivé dans des conditions réductrices, les échantillons préparés pour SDS-PAGE ne comprennent pas de DTT ou 2-mercaptoéthanol.

5.2. Purification des protéines biotinyalées.

Le culot est remis en suspension dans la solution de HENS, puis on ajoute 2 volumes de tampon de neutralisation (HEPES 20 mM, pH 7,7, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 0,5% de Triton X-100). L'échantillon est centrifugé et le précipité est éliminé.

La streptavidine-agarose est lavée avec le tampon de neutralisation sans Triton X-100. Le volume de streptavidine-agarose est ajusté à la quantité de protéines dans l'échantillon. Typiquement 15 ul / mg de protéine. Incubées pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. L'échantillon est centrifugé à 400 g pendant 2 min, en rejetant le surnageant contenant les protéines non-adhérentes à la streptavidine. Le culot avec la résine est lavé 5 fois avec du tampon de lavage (HEPES 20 mM, pH 7,7, NaCl 600 mM, EDTA 1 mM, 0,5% de Triton X-100) et centrifugé à 400 g pendant 2 min, en jetant le surnageant. 1 volume de tampon de dilution est ajouté (HEPES 20 mM, pH 7,7, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 100 mM de 2-mercaptoéthanol) et l'échantillon est incubé pendant 20 minutes à 37 ° C. La suspension est agitée doucement 2-3 fois puis centrifugée à 15000 g pendant 1 minute, et récupérer le surnageant contenant les protéines dissociées et qui étaient auparavant biotinyalées.

À ce stade, l'échantillon est prêt pour une électrophorèse SDS-PAGE après addition de 2-mercaptoéthanol. L'échantillon est porté à ébullition. Les bandes peuvent être détectées au bleu de Coomassie.

6. DETECTION DE LA PROTEINE TYROSINE NITRATION.

Après séparation des protéines par SDS-PAGE en conditions non réductrices, on utilise comme anticorps primaire l'anti-3-nitrotyrosine avec une dilution de (1/1000) (Sigma-Aldrich, USA).

7. QUANTIFICATION DES PROTEINES.

Pour la quantification des protéines on utilise un kit composé de témoin constitué de 8 patrons avec des concentrations croissantes en protéines : (Blanc, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5), et de 3réactifs : RA, RS et RB. On prépare la solution RA' composé de 20ul de RS / 1ml, et de RA, puis on l'ajoute au échantillon seulement sur une plaque d'Elisa et on rajoute le réactif RB 200 ul aux échantillons et témoins, on laisse incuber a température ambiante pendant 15 minutes, on remarque un changement de couleur des puits de l'Elisa du jaune au bleu, les 15 minutes passées la plaque d'Elisa est introduite dans un spectrophotomètre relié à un ordinateur, les résultats sont ensuite sauvegardé sur un appareil externe et transféré au Microsoft Excel ou a lieu leur traitement et analyse.

8. WESTERN BLOT.

Un transfert de protéines par western blot est réalisé pour permettre la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. C'est un outil de diagnostic complémentaire.

8.1. Électrophorèse de protéine sur gel de bi-acrylamide (SDS-page).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium ou SDS-PAGE est une technique de biochimie qui permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire. La matrice est créée par la copolymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. La solution d'acrylamide est préparée en mélangeant dans un tube de polypropylène 4 ml d'acrylamide à 30 % + 2,6 ml de solution de séparation 4X + 3,3 ml de H₂O. La cuve de l'électrophorèse est préparée en s'assurant de montage et fixation des vitres dans le support), et séquentiellement à la solution d'acrylamide est ajouté des catalyseurs de la gélification: 4 µl (gel au 12 %) de Temed et 100 µl de APS à 10 % (1 g/10 ml d'eau). Après on remplit avec H₂O sur l'acrylamide soigneusement pour ne pas mélangé avec le gel.

On Prépare la solution d'acrylamide "Stacking" qui sert à concentrer l'échantillon dans l'interaction avec le gel "Separating". C'est dans ce gel où est inséré le peigne. On mélange 0,415 ml d'acrylamide à 30 % + 0,340 ml de *solution stacking* + 1,7 ml de H₂O distillée (ce volume est le estimée pour la formation de 1 gel de 1,5 mm à 12 % d'acrylamide). A cette solution sont ajoutés les catalyseurs: 2,5 µl de TEMED + 50 µl de

APS à 10 %. On ajoute immédiatement, et s'insère le peigne en position appropriée, en évitant la formation de bulles entre les dents du peigne. On laisse polymériser pendant 30 min.

Préparer les échantillons utilisant LB 5X (10 ul), le volume d'échantillon nécessaire (50-100 ug protéine) et un volume d'eau milliQ jusqu'à compléter au volume final (50 uL). On procède à une perforation avec une aiguille sur le couvercle de l'éppendorf de l'échantillon, et a conduit à ébullition dans un bain d'eau pendant 5 à 10 minutes. Les échantillons sont système 10 secondes à une vitesse maximale pour abaisser les gouttes des parois du tube. Il dispense un volume de l'étalon de poids moléculaire (3 ul) dans les puits extrêmes du gel (numéro 1 et 10). Les échantillons sont imputés au complet (50 uL).

Les gels sont préparés et ajoutés avec des échantillons. La source d'alimentation est fixée à une tension de 130 mV pour une durée de 45 minutes. Optionnellement, les gels sont ensuite colorés avec le bleu de Coomassie pendant 30 min.

8.2. Transfert et immuno-détection (Western-blot) de protéines avec phosphatase alcaline ou PEROXYDASE.

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF. Les membranes de PVDF (Biorad) sont activées par 30 secondes dans du méthanol, 5 min en eau, jusqu'à observer que la membrane s'enfonce et cesse d'être hydrophobe et passage au tampon de transfert. La cassette du système trans-Blot Turbo de Biorad est tirée, on place dans la cassette du système une membrane compactage de nitrocellulose (Biorad) de même taille que le gel et humidifiée dans un tampon de transfert. La membrane PVDF est placée sur un gel préalablement incubé avec un tampon de transfert. On marquera convenablement les extrémités de la membrane forme identifie au gel pour identifier le type et la position des protéines transférées. Ensuite, le gel est placé sur la membrane PVDF, et au-dessus autre membrane humidifiée dans un tampon de transfert. La cassette est fermée, introduite dans le trans Blot Turbo de Biorad Il est recommandé la coloration avec rouge ponceaus pendant 5 min. La membrane est transférée à un récipient en plastique approprié à leurs dimensions pour les différentes étapes du Western-blot. S'assurer que la membrane soit complètement couverte de la solution durant l'agitation. La membrane est bloquée avec la solution de saturation pendant 2 h à température ambiante, puis lavée avec PBS-T 3 x 5 min. Elle est ensuite couverte avec l'anticorps primaire en BSA PBS-T pendant 12 h (OVERNIGHT) à 4°C. Après incubation le maximum d'anticorps primaire est récupéré, s'ajoute une marque au marqueur dans le tube pour indiquer une utilisation. On peut utiliser la solution d'anticorps jusqu'à 7 fois. La solution d'azoture de sodium prévient toute contamination éventuelle. Ensuite, il y a réalisation d'un lavage au PBS-T 3 x 5 min. La membrane est ensuite couverte avec l'anticorps secondaire en BSA PBS-T pendant 2 h à température ambiante, la dilution

est de 1/10000(Cette solution d'anticorps est jetée),la membrane est lavée avec *du PBS-T* 3 x 5 min, et une fois avec PBS sans Tween-20 1 x 5 min.

La membrane passe finalement à l'étape de révélation par chimiluminescence par l'essai d'ECL (ECL, Thermo Scientific). On laisse tempérer pendant 5 minutes dans un tube conique ou a été mélangé un volume de la solution A avec un autre volume de la solution B, le bord de la membrane est séché avec du papier buvard. Le volume de solution de révélation est diffusé par une pipette de façon homogène au-dessus de la membrane PVDF au visage des protéines, laissant couvrir 1 minute. Ce processus pourrait avoir lieu en lumière naturelle (ne nécessite obscurité). Après incubation on décante tout le liquide excédentaire et sèche le bord de la membrane avec du papier buvard. La membrane de PVDF est transférée dans une pellicule transparente qui sert de support jusqu'à la Chambre de révélation. La membrane PVDF est déposée avec des pinces dans la plate-forme du Chemidoc-it 500 à la hauteur appropriée. La membrane est Lavée avec PBS-T 2 x 5 min, et finalement congelée et le stripping est initié.

La membrane est lavée 2x5 min au PBS-T, incubée à la solution de stripping pendant 2 h à 4°C ,le stripping est ensuite jeté, la membrane lavée au PBS-T 2x5 min puis elle est prête pour le blocage (saturation).

8.3. β -actine.

Un filament d'actine, ou microfilament, est un homopolymère d'actine, protéine d'environ 43 kDa.C'est un constituant essentiel du cytosquelette des cellules eucaryotes, ainsi que des fibres musculaires.C'est pour cela qu'elle est détectée sur les échantillon, comme un control, elle confirme la présence des proteines sur les membranes, donc le bon déroulement de l'électrophorèse et sert principalement de témoin de poids moléculaire connu 43 kDa, ce qui permet une meilleurs analyse et comparaison des bandes.

Après 2 heures de STRIPPING dans la chambre froide à 4C°, les membranes sont sorties, lavées 3 fois par du PBS-T 5 min. L'anticorps primaire de B-actine est sorties du congélateur de -20C°, on le laisse décongeler, on peut faciliter sa décongélation en le frottant entres les mains sous eau courante sans toucher le bouchon du tube pour éviter toute entrée d'eau, l'anticorps anti B-actine utilisé est à une dilution de 1 :1000, el est ajouter aux membranes et incuber toute la nuit à 4C°. Les membranes sont sorties de la chambre froide, l'Ac primaire est récupéré, on réalise deux lavages de 5 minutes au PBS-T, on prépare la solution d'anticorps secondaire de lapin : 1ul d'Ac dans 10ml de BSA (Bovine Sérum Albumine) dissoute dans du PBS-T. On rajoute l'Ac secondaire et incube à température ambiante pendant une heure sous agitation modéré (marquer 25 sur l'agitateur). Deux lavages de 5 minutes au PBS-T puis un lavage de 5 minutes au PBS 1X, et finalement révélation par chimiluminescence.

8.4. Révélation par chimiluminescence.

La révélation est réalisée par le kit (Pierce ECL Western Blotting Substrate from Thermo Scientific) déjà cité dans transfert et immuno-détection. On utilise un dispositif spécial constitué d'un révélateur UVP ChemiDoc relié à un ordinateur. Le dispositif est relié à un logiciel UVP qui permet l'analyse et le traitement des images capturées.

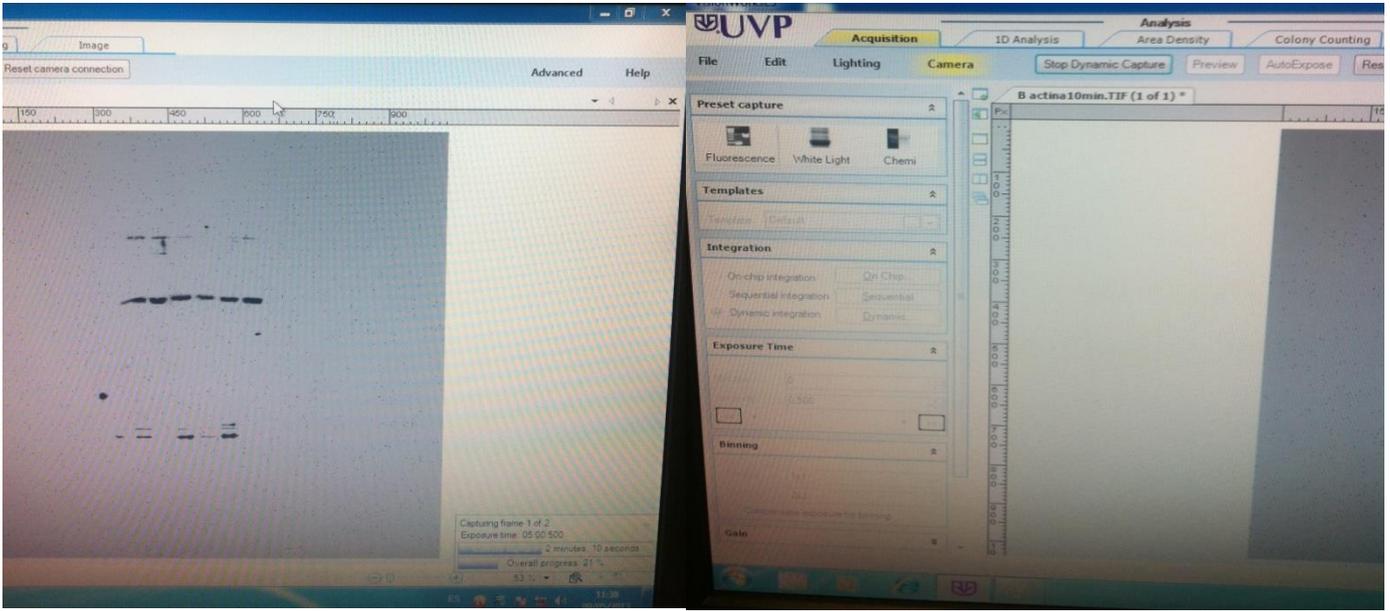


Figure 6:Photos du logiciel UVP utilisé en chimiluminescence.

9. COUPES HISTOLOGIQUES AU MICROTOME.

Consiste en la réalisation de coupes histologiques d'échantillon de tumeurs de foie fixés sur paraffine, et récupération des coupes sur lames, réalisation d'au moins 4 coupes par lame.



Figure 7:Photo d'un microtome Leica RM 2255.

10. COUPES HISTOLOGIQUES AU CRYOSTATE.

Consiste en la réalisation de coupes histologiques des échantillons de tumeurs fixés au para-formaldehyde au 4%, pour le cryostat les sections sont généralement de 7 μ m de grosseur, et se font à une température de -26C°, le passage des coupes sur lames se fait par simple changement de température (au moins 6 coupes par lames et 4 lames par échantillon).

RESULTATS ET DISCUSSIONS:

1. Résultats des quantifications des protéines.

Après avoir effectué la quantification des protéines par le kit Pierce ECL Western Blotting Substrate de Thermo Scientific, et après la lecture de la plaque d'ELISA par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750nm, on a les résultats suivants (Tableaux 1, 2 et 3).

Tableau 1 : Résultats du spectrophotomètre pour CASPASE-8 et OXIBLOT.

Endpoint Read Test Wavelength: 750 nm												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoin	Blanc=0,091	0,105	0,118	0,169	0,195	0,201	0,279	0,31				
Echantillon	0,256	0,201	0,404	0,297	0,322	0,227	0,154	0,135	0,181	0,15	0,174	0,109

Tableau 2 : Résultats du spectrophotomètre pour Biotin switch.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Témoin	Blanc=0,088	0,144	0,149	0,198	0,23	0,257	0,315	0,328
Echantillon	0,143	0,132	0,123	0,166	0,134	0,148		

Tableau 3 : Résultats du spectrophotomètre pour la Tyrosine.

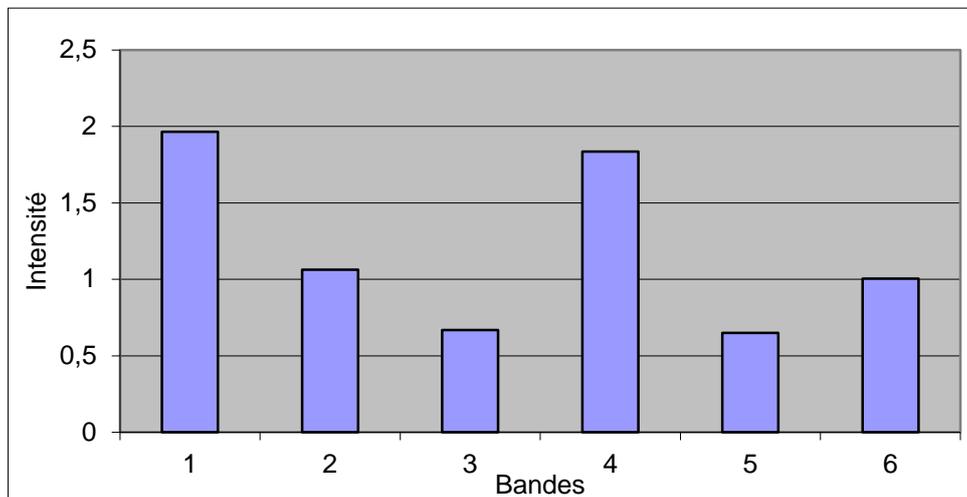
Dépôt	1	2	3	4	5	6	7	8
Témoin	Blanc=0,09	0,114	0,146	0,197	0,27	0,33	0,351	0,343
Echantillon	0,194	0,218	0,247	0,502	0,273	0,166		

La valeur du blanc, dépôt 1, est soustraite et les résultats de caspase-8 et oxiblot, biotin et tyrosine sont analysés à Microsoft Excel.

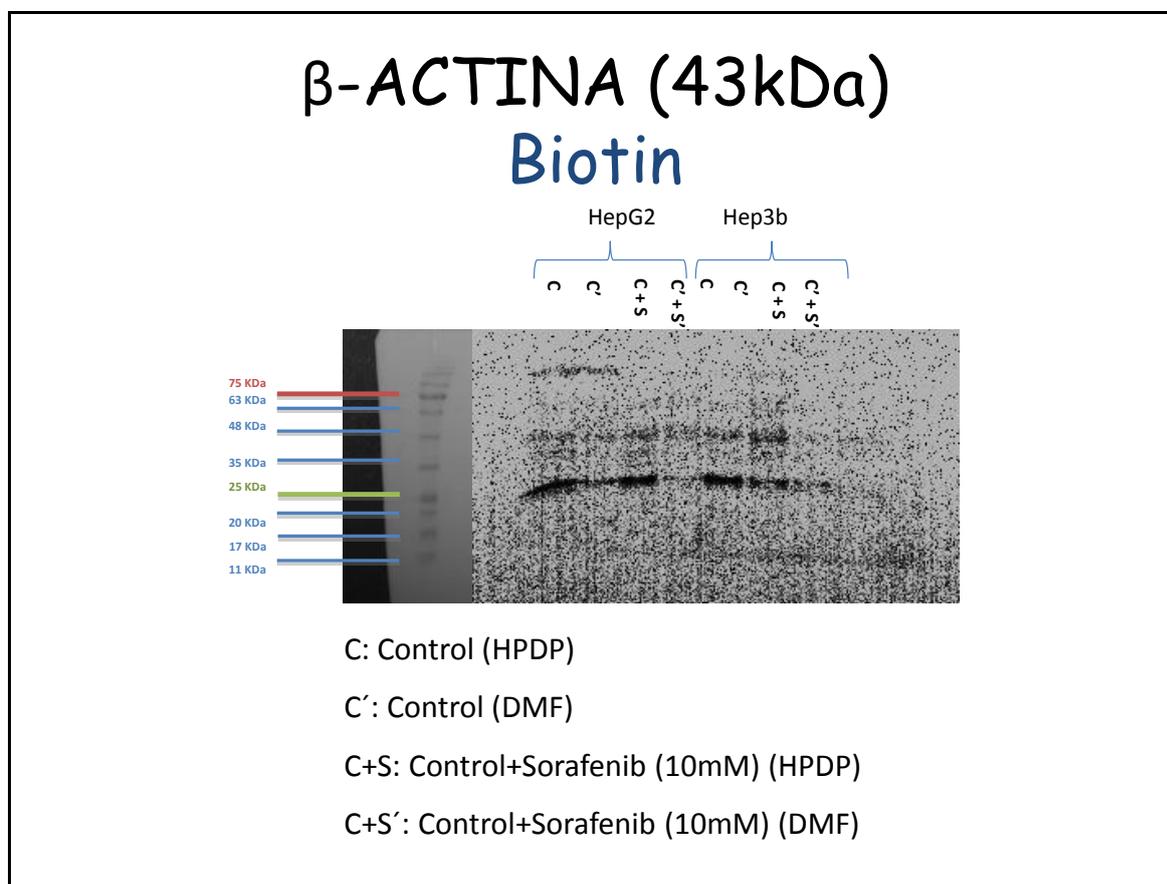
Après traitement des données on obtient des courbes à partir desquelles sont affichées les concentrations et les volumes nécessaires pour la préparation de nos échantillons avant le western-blot. Après avoir terminé le western blot pour les protéines recherchées et pour la B-actine, et après révélation par le kit on obtient les résultats sous forme de membranes qui représentent ou non des bandes de différentes tailles (poids

moléculaires) avec des marqueurs de tailles. Le western blot a été traité par le logiciel Image J à fin de quantifier le signal des bandes en se basant sur l'intensité des bandes ce qui a permis de transformer ces données en graphique pour une meilleure analyse.

Figure 1 : Détection des protéines biotinilées (Biotin-Switch) :

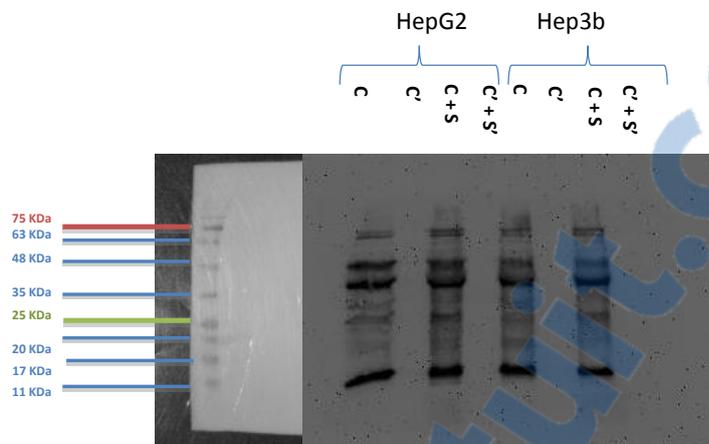


Selon ce graphique, la bande 1 (Control), est presque 2 fois plus intense que la bande 2 (control+sorafénib) dans les cellules HepG2, alors que la bande 3 (control) est 3 fois moins intense que la bande 4 (control+sorafénib) dans les cellules Hep3b, ce qui est aussi le cas pour les bandes 5 et 6 dans les cellules



Huh7.

BIOTIN SWITCH 1

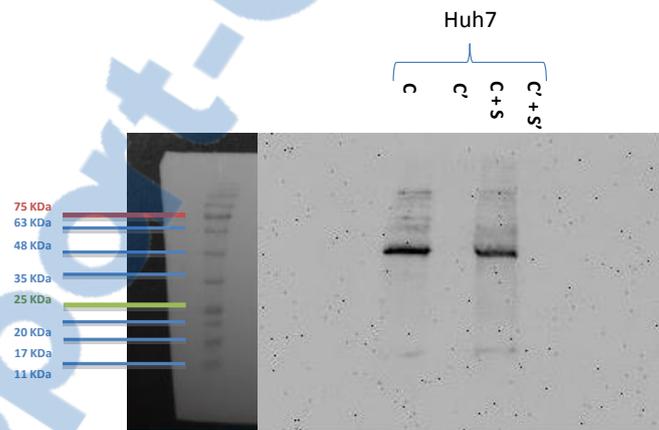


C: Control (HPDP)

C': Control (DMF)

C+S: Control+Sorafenib (10mM) (HPDP)

C+S': Control+Sorafenib (10mM) (DMF)



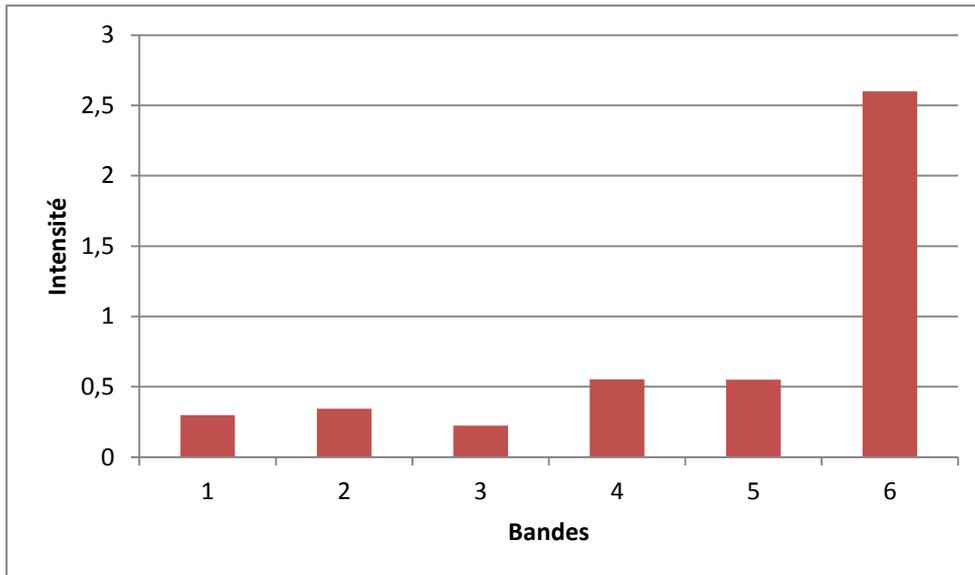
C: Control (HPDP)

C': Control (DMF)

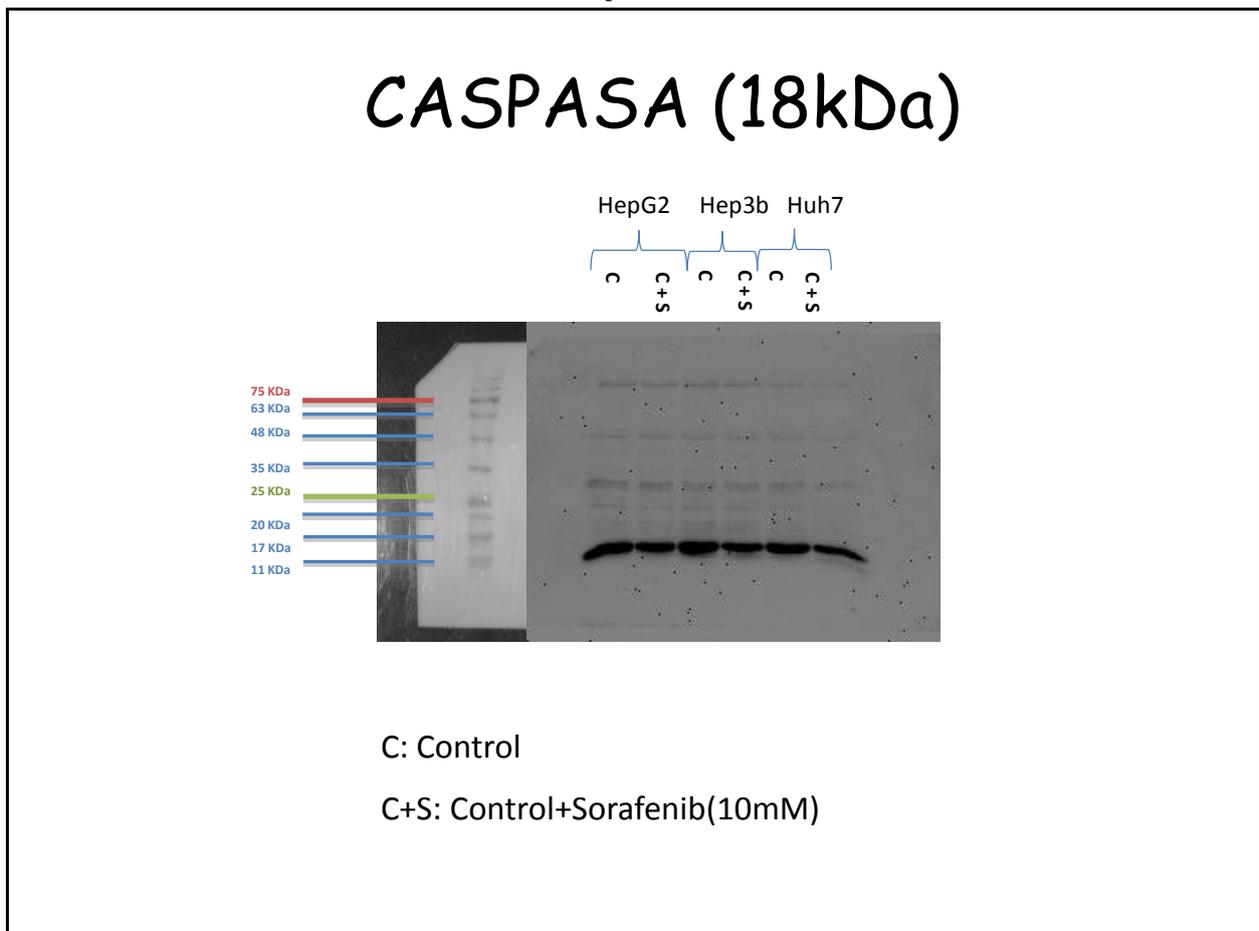
C+S: Control+Sorafenib (10mM) (HPDP)

C+S': Control+Sorafenib (10mM) (DMF)

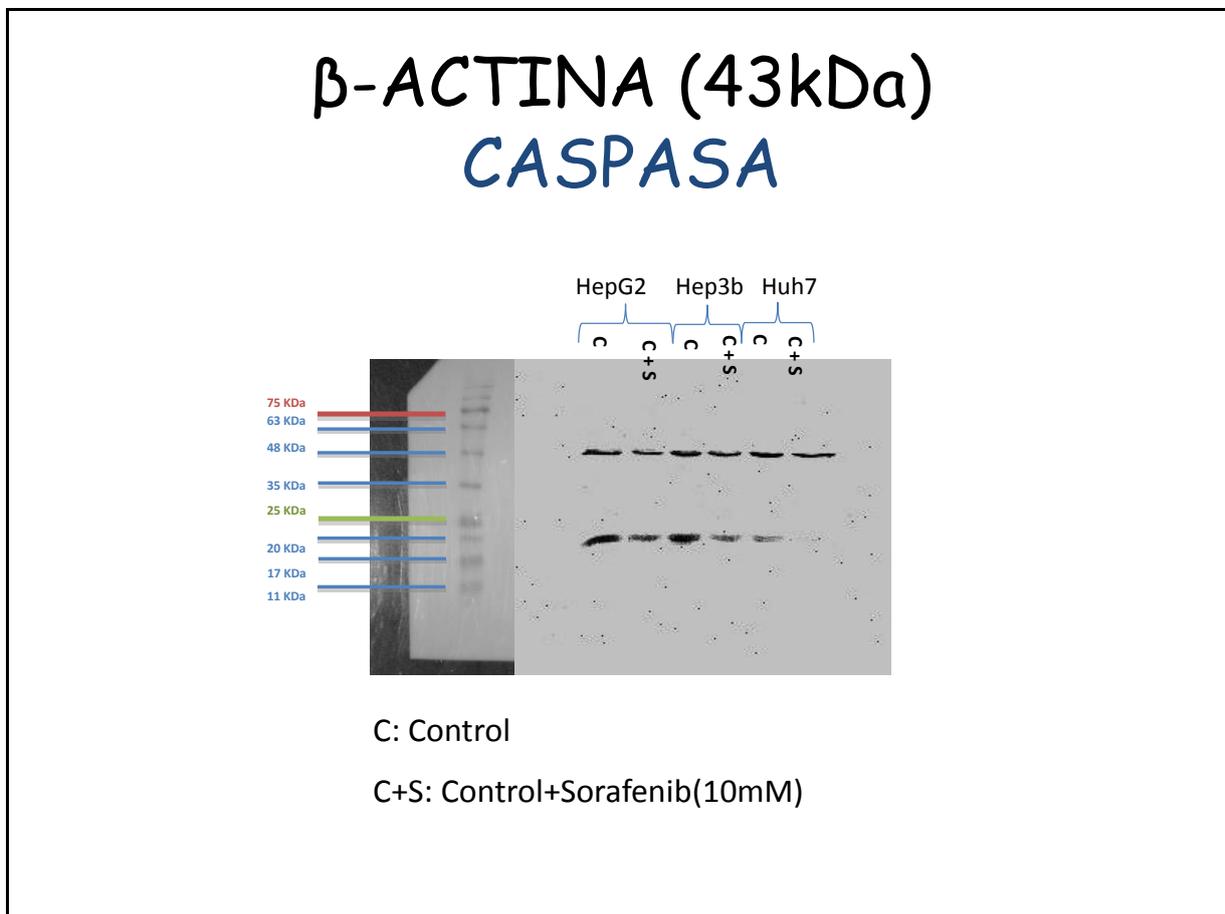
Graphique 2 : Caspase-8 18 kD.



Caspase-8 :

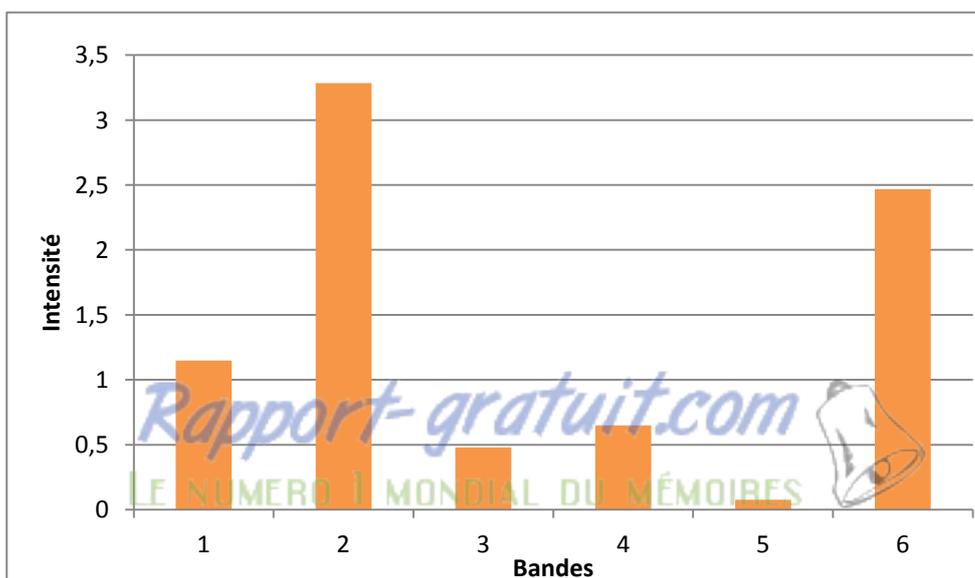


A partir de la figure 2, en analysant les lignes de bandes des environs de 18 kDa, on remarque que la bande 2 qui correspond au control est plus intense que la bande 1 du control, et la bande 4 du control+sorafénib plus intense que 3 du control, ainsi que la bande 6 du control+sorafénib qui est 5 fois plus intense que la bande 5 du control.

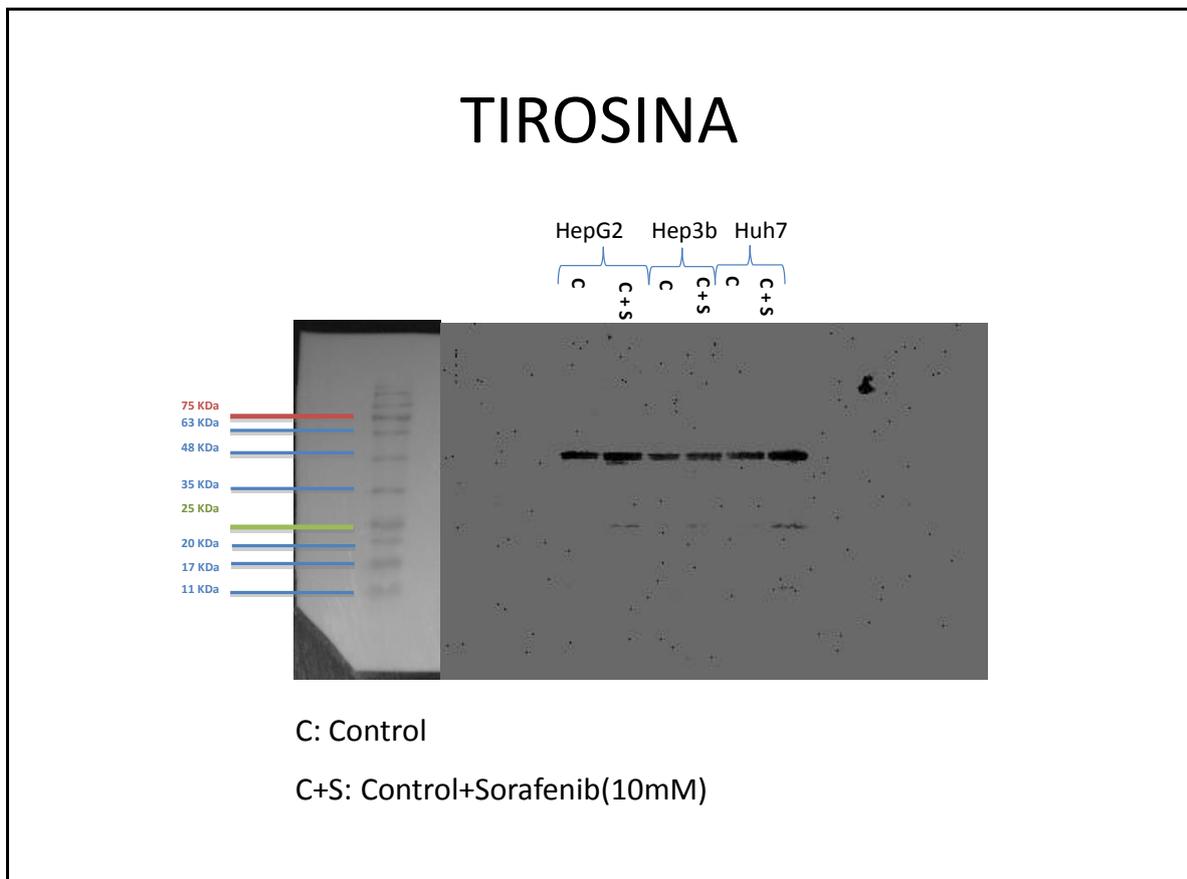


La beta-actine correspond à la ligne de bande proche de 43 kDalton.

Graphique 3 : Détection de Nitration en Tyrosine.

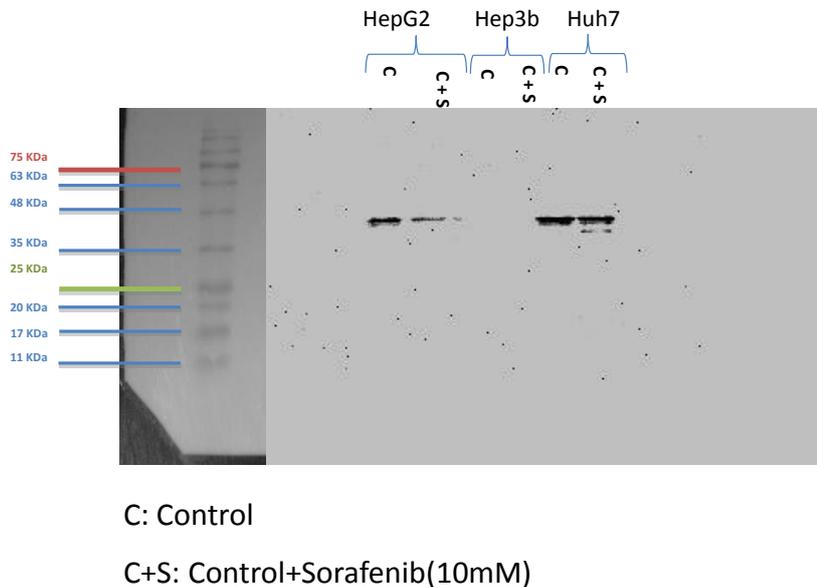


Détection de Nitration en Tyrosine :

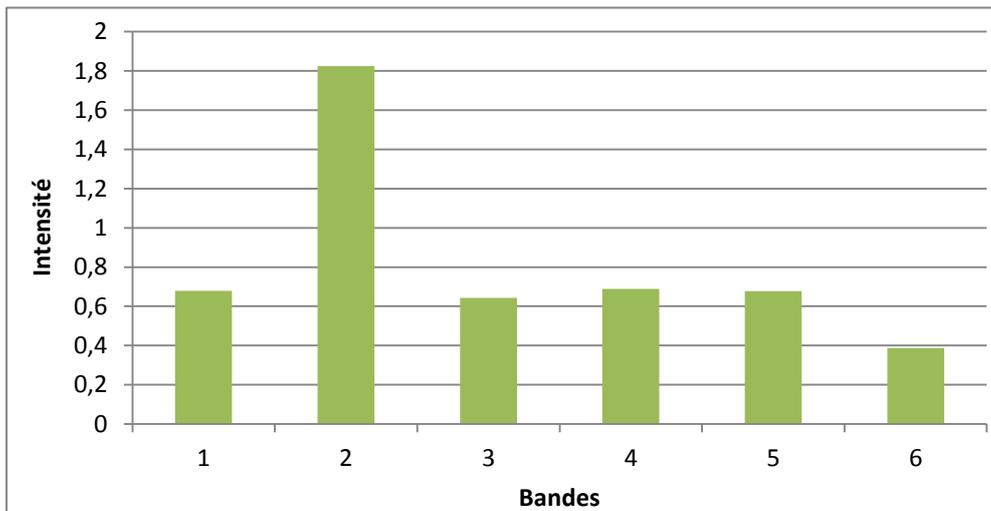


On constate que les bandes 2,4 et 6 correspondant aux control+sorafénib sont beaucoup plus intenses que les bandes 1,3 et 5 correspondant aux control.

β-ACTINA (43kDa) TIROSINA



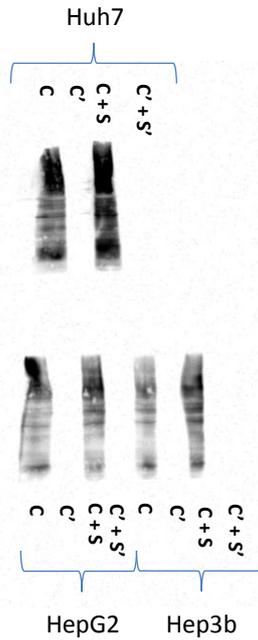
Graphique 4 : Détection des protéines carbonylées (kit Oxiblot).



La bande 2 est beaucoup plus intense que la bande 1, on peut le constater sur le graphique comme sur la membrane, pour les bandes 3 et 4 on ne peut faire la différence entre l'intensité des bandes sur la membranes cela dit le graphique nous montre que la bande 4 est légèrement plus intense que la bandes 3.

La bande 5 est plus intense que la bande 6.

OXIBLOT



C: Control (DNP)

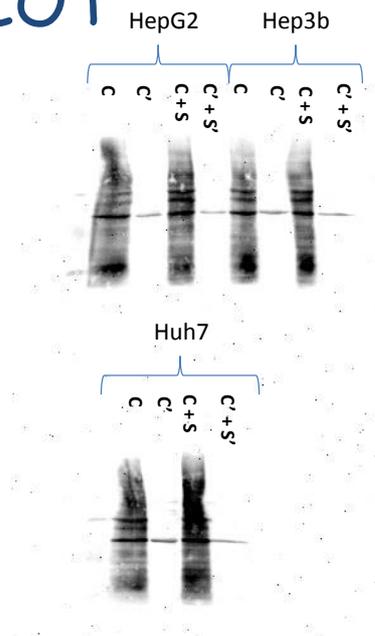
C-: Control (DNPH)

C+S: Control+Sorafenib (10mM) (DNP)

C+S-: Control+Sorafenib (10mM) (DNPH)

β -ACTINA (43kDa)

OXIBLOT



Ces résultats montrent que le sorafénib diminue la nitrosylation chez la lignée HepG2. Cependant, il augmente la nitrosylation dans les deux lignées Hep3b et Huh7.

Le sorafénib augmente la caspase-8 dans les cellules HepG2, Hep3b et Huh7. Le sorafénib augmente nettement la nitration de la Tyrosine dans les cellules HepG2 et Huh7 et légèrement dans les cellules Hep3b.

Le sorafénib augmente la carbonylation chez HepG2 et Hep3b tandis qu'il reste contradictoire pour Huh7 pour laquelle il l'augmente ou la diminue selon l'expérience.

De plus des effets initialement décrits du sorafénib, et son action en tant qu'inhibiteur multi-kinases, qui joue un rôle dans la diminution de la prolifération des cellules tumorales, le sorafénib possède également une action d'augmentation de l'apoptose (mort cellulaire) par induction de modifications post-traductionnelles, qui augmentent la formation des récepteurs TNF-R1 sur la surface de la membrane des hépatocytes et la fixation du ligand TNF- α sur ce dernier dans la lignée hépatique Huh7. TNF-R1 est un récepteur qui aboutit à l'activation de la caspase-8, qui déclenche une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule et induit l'apoptose (par le gène suppresseur de tumeur p53 muté).

Dans les deux lignées cellulaires Huh7 et Hep3b, le sorafénib agit en augmentant la formation de CD95, récepteur du ligand CD95L, qui induit l'apoptose par voie extrinsèque en activant la caspase-8.

Dans les trois lignées cellulaires HepG2, Hep3b et Huh7 il a été démontré que sorafénib augmente les récepteurs Trail-R1 du ligand Trail qui aboutissent à l'apoptose (par expression de p53).

CONCLUSION

La présente étude a été réalisée au sein de l'Institut de bio-médecine de Séville (IBIS), consacrée à un sujet innovant sur la détermination des modifications post-traductionnelles (cys-nitrosylation, nitration en tyrosine, carbonylation) durant le traitement au sorafénib dans les lignées HepG2, Hep3b et Huh7, et l'influence de ces modifications sur les récepteurs de la mort cellulaire (TNF-R1, CD95 et Trail-R1).

Les résultats obtenus révèlent que :

Le sorafénib diminue la nitrosylation chez la lignée HepG2. Cependant, la nitrosylation augmente dans les deux lignées Hep3b et Huh7.

Le sorafénib augmente la caspase-8 dans les cellules HepG2, Hep3b et Huh7.

Le sorafénib augmente nettement la nitration de la Tyrosine dans les cellules HepG2 et Huh7 et légèrement dans les cellules Hep3b.

Le sorafénib augmente la carbonylation chez HepG2 et Hep3b tandis qu'il reste contradictoire pour Huh7 pour laquelle il l'augmente ou la diminue selon l'expérience.

Perspective : Après confirmation du rôle de sorafénib/NO, une bithérapie ciblée serait alors envisagée et on assisterait à une révolution dans le traitement des hépatocarcinomes.

Références bibliographiques :

Folkman J, 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications, N Engl J Med; 285: 1182-1186.

Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. J Biol Chem 1999; 274: 36031-36034

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994; 54:4855-4878

Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, Hofseth LJ, Shields PG, Billiar TR, Trautwein C, Hohler T, Galle PR, Phillips DH, Markin R, Marrogi AJ, Harris CC. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: oxyl radical overload diseases. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:12770-12775

Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. Cancer Res 2000; 60: 3333-3337

Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. FEBS Lett 1994; 356: 295-298.

Schweizer M, Richter C. Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. Biochem Biophys Res Commun 1994; 204: 169-17.

Esneaul, S. 2009. Traitement des hépatocarcinomes .THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1 sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne.

INC, Octobre 2011. *L'Institut national du cancer est l'agence nationale sanitaire et scientifique chargée de coordonner la lutte contre le cancer en France.*

FCF. 2012. La Fondation canadienne du foie.

American Liver Foundation 2011, 1-800-GO-LIVER.

Leica Biosystems Nussloch GmbH Heidelberger Str. 17-19 69226 Nussloch, German.

World J Hepatol 2010 September 27; 2(9): 337-344 ISSN 1948-5182 (online) © 2010 Baishideng.

NO Strategies, Jordi Muntané, Liver Research Unit, Maimonides Institute for Biomedical Research of Cordoba (IMIBIC), "Reina Sofia" University Hospital, Cordoba E-14004, Spain.

Biochemistry (Mosc). 1998 Jul;63(7):766-81. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Source :Department of Surgery, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA.

Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. FEBS Lett 1994; 345: 50-54.

Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. Free Radic Biol Med 2002;33:562-71.

Martinez A, Dalfo E, Muntane G, Ferrer I. Glycolytic enzymes are targets of oxidation in aged human frontal cortex and oxidative damage of these proteins is increased in progressive supranuclear palsy. J Neural Transm 2008;115:59-66.

Moon KH, Hood BL, Kim BJ, Hardwick JP, Conrads TP, Veenstra TD, et al. Inactivation of oxidized and S-nitrosylated mitochondrial proteins in alcoholic fatty liver of rats. Hepatology 2006;44:1218-30.

ANNEXE

1. Présentation de l'Institut de biomédecine de Séville IBIS.

Présentation de l'IBIS:

L'Institut de recherche biomédicale de Séville (Institut biomédical de Seville - ibis), a été créée le 24 Mars 2006 par la vertu d'un accord signé par le ministère de la Santé du conseil d'Andalousie «Junta de Andalucía », le ministère de l'innovation, des sciences et affaires de la junte de l'Andalousie, le service andalou de la santé, de l'Université de Séville, et le Conseil espagnol de la recherche scientifique (Consejo Superior de Investigaciones Científicas - CSIC).

IBIS représente la continuité d'un projet initié avec la création en 2000 du Laboratoire de recherches biomédicales (Laboratorio de Investigaciones Biomédicas - LIB) grâce à un accord entre le ministère de la Santé du conseil d'Andalousie « Junta de Andalucía », le Service andalou de la santé et de l'Université de Séville.

Mission :

La mission de l'ibis est de contribuer au renforcement de la recherche biomédicale en Espagne, en vue de devenir un centre de recherche d'excellence dans le sud de l'Europe.

Vision :

IBIS a été établi comme un centre de recherche biomédicale pluridisciplinaire au sein du complexe qui abrite le Centre Hospitalier Universitaire Virgen del Rocío, un centre de soins de haut niveau, de l'éducation et de la recherche. Son principal objectif est de mener des recherches compétitives au niveau international sur les causes des pathologies les plus répandues dans la population, et de développer de nouvelles méthodes pour le diagnostic et le traitement.

IBIS est basé sur la recherche fondamentale au niveau moléculaire et cellulaire, en vue de promouvoir le transfert rapide des connaissances à la pratique clinique, et l'amélioration de la qualité de la recherche clinique et épidémiologique.

2. Sujet de recherche.

Le travail scientifique effectué par notre groupe est liée à trois domaines principaux:

- Caractérisation génétique et fonctionnelle de cancer du pancréas. Les modèles cliniques et expérimentales.
- Mort/prolifération cellulaire dans le carcinome hépatocellulaire.
- Régénération hépatique par injection de cellules souches dans le foie. Les modèles cliniques et expérimentales.

Chercheur Responsable:

Dr. Francisco Javier Padillo Ruiz. Jefe de Servicio de Cirugia General y Digestivo/Catedratico de Cirugia.
Hospital Universitario Virgen del Rocio/Universidad de Sevilla.

4. Kit Oxyblotc S7150.

OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit Catalog No. S7150.

FOR RESEARCH USE ONLY Not for use in diagnostic procedures.

USA & Canada. USA & Canada Phone: +1(800) 437-7500 Fax: +1 (951) 676-9209.

Composants du kit :

Part #	Component	Volume	Storage Temp.
90448	10X 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) Solution	400 µL	2°C to 8°C
90449	Neutralization Solution	3.0 mL	2°C to 8°C
90450	Mixture of Standard Proteins with attached DNP residues	75 µL	2°C to 8°C (until 1st use)
90451	1° Antibody: Rabbit Anti-DNP Antibody	4.0 mL	2°C to 8°C
90452	2° Antibody: Goat Anti-Rabbit IgG (HRP-conjugated)	2.0 mL	2°C to 8°C
90463	10X Derivatization-Control Solution	400 µL	2°C to 8°C

Protocol :

Prepare Protein Solution

Derivatize the Carbonyl Groups

Separate the Protein Sample by SDS-PAGE

Transfer to a Membrane

Block Non-Specific Sites

Incubate in Primary Antibody

Incubate in HRP-Conjugated Secondary Antibody

Add Chemiluminescent Reagent

Expose to film

5. Réactifs de l'électrophorèse.

SEPARATING

Tableau 4 : Préparation de 400 ml 4X SEPARATING.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
Tris-base pH 8,8 (1,5 M)	: 45,43 g/l (0,375 M)	72,66 g	121,14	ÉTAGÈRE centrale	SIGMA T1503
SDS (0,4 %)	1 g/l (0,1 %)	1,6 g	288,4	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A2263

Ajustement du pH avec HCl concentré

STACKING

Tableau 5 : Préparation de 200 ml 4X STACKING.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	#Entrepôt	# Produit
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	19,70 g/l (0,125 M)	15,76 g	157,60	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A3452
SDS (0,4 %)	1 g/l (0,1 %)	0,8 g	288,4	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A2263

Ajustement du pH avec NaOH concentré

RUNNING BUFFER**Tableau 6** : Préparation de 3000 ml 10XRUNNING BUFFER.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
Tris-base pH 8,3 (250 mM)	3,03 g/l (25 mM)	90,85 g	121,14	ÉTAGERE centrale	SIGMA T1503
SDS (1 %)	1 g/l (0,1 %)	30 G	288,4	ÉTAGERE centrale	AppliChem A2263
Glycine (1,92 M)	14,41 g/l (192 mM)	432,40 G	75,07	ÉTAGERE centrale	AppliChem A4554

Ajustement du pH avec HCl concentré. (Les tampons ci-dessus peuvent être conservé à température ambiante).

ACRYLAMIDE : 30 % Acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1) Solution Bio-Rad 161-0158.

TEMED :TEMED (50 ml): Bio-Rad 161-0801.

APS**Tableau 7** :Préparation de 10 ml 1XAPS

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
Persulfate d'ammonium (10 %)	0,1 g/ml	1 g	228,20	ÉTAGERE centrale	Bio-Rad 161-0700

Tableau 8 : Préparation de 10 ml 5XLB

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# local.	# Produit
Tris-HCl pH 6,8 (0,3125 M)	9,85 MG/ML (0,0625 M)	0,4925 G 3,125 ML Tris-HCl 1M PH 6,8	157,6	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A3452
SDS (10 % p/v)	20 MG/ML (2 % p/v)	1 G	288,4	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A2263
Glycérol (50 % v/v)	0,1 ml/ml (10 % v/v)	5 ML	92,09	ÉTAGÈRE centrale	Amresco 0854
DTT (0,5 M)	15,42 MG/ML (0,1 M)	0,771 G	154,2	Frigorifique	Sigma D-9779
Bleu Bromophénol (0,05 % p/v)	0,1 mg/ml (0,01 % p/v)	5 MG	691,9	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A3640

DISSOUS dans l'eau milliQ, aliquote et conservées à -20°C

(Il gèle en aliquotes à -20°C). Au lieu de DTT (0,1 M p/v) On peut utiliser 2-MERCAPTOETHANOL (1 % v/v).

COOMASSIE**Tableau 9 : Préparation de 100 ml 1x de COOMASSIE**

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
Coomassie R-250 (0,25 %)	2,5 G/ml	0,1 G			Sigma B-1131

*Dans du méthanol à 40 % + Acétique à 10 %

TABLEAUX DES DENSITES POUR GELS "SEPARATING" ET "STACKING" :

Tableau 10 : Volumes pour 4 gels de mini-Protean (BioRad) SEPARATING.

% Gel Separating	Acrylamide	Separating 4x	Eau	TEMED	APS à 10 %
6	8 ml	10,4 ml	21,1 ml	32 uL	400 uL
8	10,7 ml	10,4 ml	18,6 ml	24 uL	400 uL
10	13,3 ml	10,4 ml	15,8 ml	16 uL	400 uL
12	14 ml	10,4 ml	13,2 ml	16 uL	400 uL
15	20 ml	10,4 ml	9,2 ml	16 uL	400 uL

Tableau 11 : Volumes pour 4 gels de mini-Protean (BioRad) STACKING.

% Gel Stacking	Acrylamide	Stacking 4x	Eau	TEMED	APS à 10 %
4	1,7 ml	1,26 ml	6,8 ml	10 uL	100 uL

Tableau 12 : Volumes pour 2 gels de mini-Protean (BioRad) Separating.

% Gel Separating	Acrylamide	Separating 4x	Eau	TEMED	APS à 10 %
6	4 ml	5,2 ml	10,6 ml	16 uL	200 uL
8	5,3 ml	5,2 ml	9,3 ml	12 uL	200 uL
10	6,7 ml	5,2 ml	7,9 ml	8 uL	200 uL
12	8 ml	5,2 ml	6,6 ml	8 uL	200 uL
15	10 ml	5,2 ml	4,6 ml	8 uL	200 uL

Tableau 13 : Volumes pour 2 gels de mini-Protean (BioRad) Stacking.

% Gel Stacking	Acrylamide	Stacking 4x	Eau	TEMED	APS à 10 %
4	830 uL	680 uL	3,4 ml	5 uL	100 uL

6. Réactifs du transfert sur membrane.

Tampon de transfert

Tableau 14 : Préparation de 1000 ml 1X Tampon de transfert.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
Tris-base pH 8,3 (48 mM)	5,81 G/l (48 MM)	5,81 G	121,14	ÉTAGÈRE centrale	SIGMA T1503
SDS (0,0375 %)	0,375 G/l (0,0375 %)	0,375 G	288,4	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A2263
Méthanol (20 % v/v)	200 ML/l (20 %)	200 ML	32,04	Solvants organiques	SIGMA 179957
Glycine (39 MM)	2,928 G/l (39 MM)	2,928 G	75,07	ÉTAGÈRE centrale	AppliChem A4554

Ajustement du pH avec HCl concentré.

POUNCEAU : préparation de 100 ml : 0,1 % ponceau S + 5 % à. acétique.

Tampon PBS **Tableau 15** :Préparation de 3L ml 10XTampon PBS.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mo l	# Entrepôt	# Produit
NaCl (1,36M)	136 MM	240 G	58,44	ÉTAGÈRE centrale	Merck 1.06404
KCl (26 mm)	2,6 MM	6 G	74,56	ÉTAGÈRE centrale	1362 ApliChem
Na ₂ HPO ₄ (80 mm)	8 MM	34,4304 G	141,96	ÉTAGÈRE centrale	Sigma S9763
KH ₂ PO ₄ (17 mm)	1,7 MM	7,2 G	136,09	ÉTAGÈRE centrale	A1364 ApliChem

Préparations les 3 l à 10 x, mettre en bidon, et de mener jusqu'à 30 L avec 27 L d'eau distillée.

Tampon PBS-T (préparer au moment de leur utilisation).

Tableau 16 :Préparation de 1000 ml 1X Tampon PBS-T.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
PBS 1x	136 MM NaCl, 2,6 mM KCl, 8 Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄	1 L		En bidon	
Tween 20	0,05 %	500 MI	1227,72	ÉTAGÈRE centrale	A4974 ApliChem

Solution de blocage (préparer au moment d'utilisation)

Tableau 17 : Préparation de 200 ml 1X Solution de blocage

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
PBS	136 MM NaCl, 2,6 mM KCl, 8 Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄	Compléter jusqu'à 200 ml			
Tween-20	0,05 %	100 µl	1227,72	ÉTAGÈRE centrale	A4974 ApliChem
Nonfat dried milk powder	5 %	10 G		ÉTAGÈRE centrale	A0830 Aplichem

Une fois dissout, le lait en poudre est filtré par l'intermédiaire d'un entonnoir, pour s'assurer qu'il ne reste pas de grumeaux.

Important* en cas de recherche de *fosfoprotéinas* compléter avec BSA de **0,5 à 1 %** étant donné que la caséine de lait est une transmembranaire.

Tableau 18 : Solution de dilution anticorps Préparation de 50 ml 1X.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# Entrepôt	# Produit
PBS	136 MM NaCl, 2,6 mM KCl, 8 Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄	Compléter jusqu'à 50 ml			
Tween-20	0,05 %	25 MI	1227,72	ÉTAGÈRE centrale	A4974 ApliChem
BSA	1 %	500 MG	68000	4° C	A6588 ApliChem
Ázida sodique	0,02 %	50 µl solution mère 20 % (1/1000)	65,01	ÉTAGÈRE centrale	A1430 ApliChem

Stipping SOLUTION

Tableau 19 : préparation de 500 ml 1x de Stipping SOLUTION.

Composé	Conc. 1X	Prendre	Mol	# local.	# Produit
Tris-HCl pH 7,4 (0,01 M)	1,576 MG/ML (0,01 M)	0,788 G 3,333 ML DE Tris-HCl 1,5 M pH 7,4	157,6	ÉTAGERE centrale	AppliChem A3452
NP40 (3 % v/v)	30 ml/l	15 ML Nonidet P40	-	ÉTAGERE centrale	AppliChem A1694
NaCl (0,15 M)	8,766 MG/ML (0,15 M)	4,383 G 75 ML NaCl 1 M	58,44	ÉTAGERE centrale	Merck 1.06404