

Mémoire

Auteur : Jeunehomme, Lisa

Promoteur(s) : Galleni, Moreno; Bellahcene, Akeila

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/20948>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège – Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Vie

Laboratoire de Recherche sur les Métastases

—
GIGA Cancer

**Rôle du méthylglyoxal au niveau des
cellules cancéreuses du cancer
colorectal : impact sur la voie
de signalisation Wnt**

Mémoire en vue de l'obtention du grade de Master en
Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire

Lisa Jeunehomme

Promotrice : Pr. Akeila Bellahcène

Co-Promoteur : Pr. Moreno Galleni

Année académique 2023-2024 – Septembre 2024

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice, Pr Bellahcène, pour le soutien inestimable qu'elle m'a apporté tout au long de ce travail. Son engagement dépasse largement les attentes habituelles, avec un temps considérable consacré à me conseiller, à participer aux réunions, et ce, bien souvent en dehors des heures de travail. Son dévouement, ses conseils avisés, et sa disponibilité constante ont été d'une grande aide pour mener à bien ce mémoire, et je lui en suis profondément reconnaissante.

Je remercie également mon co-promoteur, Pr Galleni, qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce mémoire au sein du laboratoire de recherche LRM.

Je souhaite également remercier chaleureusement les membres de mon jury pour le temps qu'ils consacrent à la lecture et à l'évaluation de mon travail. Votre expertise et vos commentaires constructifs sont essentiels pour la réussite de ce mémoire.

Un merci tout particulier à Ferman pour le temps passé à m'apprendre les manipulations en laboratoire et pour l'ambiance positive qu'il apporte chaque jour. Je remercie également Naima pour sa patience en culture cellulaire, mais aussi pour son empathie et sa bienveillance dans la vie quotidienne au laboratoire. À Victoria, je tiens à exprimer ma gratitude pour sa joie de vivre si intense qui illumine nos journées, et à Fanny pour sa disponibilité et son aide à chaque fois que j'avais des questions. Un grand merci également à Emilie qui, bien que brièvement, a su m'apporter son soutien.

Je n'oublie pas de remercier sincèrement toutes les personnes de l'équipe de Pr Peulen pour leurs conseils précieux lors des réunions du lundi, ainsi que l'ensemble du personnel du LRM pour leur patience, leur disponibilité, et leur esprit d'équipe. Leur aide précieuse et leur soutien ont grandement facilité le déroulement de ce projet.

Enfin, je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire.

Résumé

Ce mémoire porte sur l'exploration des effets du méthylglyoxal (MG) sur les voies de signalisation Wnt dans des modèles de cancer colorectal (CRC). Le cancer colorectal est l'une des principales causes de mortalité liée au cancer dans le monde, et la voie Wnt joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la migration des cellules cancéreuses. Cependant, l'influence du stress de glycation, en particulier par le MG, sur cette voie reste peu explorée.

L'objectif principal de ce travail était de déterminer comment le MG affecte l'activation de la voie Wnt dans différentes lignées cellulaires de CRC (HT29, SW480). En particulier, nous avons cherché à comprendre si le MG modifie l'expression des enzymes de détoxification et la formation d'adduits protéiques spécifiques, et comment ces modifications impactent l'activité de la voie Wnt.

Les résultats obtenus montrent que le MG induit une augmentation de l'expression de GLO1 dans les lignées cellulaires de CRC, suggérant une réponse adaptative au stress de glycation. De plus, des différences ont été observées dans l'expression de l'AKR1B10, avec une absence notable dans les cellules SW480, alors qu'elle est augmentée dans les cellules HT29 en réponse au MG. En ce qui concerne la voie Wnt, le traitement au MG a entraîné une augmentation de la localisation nucléaire de la β -caténine active, particulièrement marquée dans les cellules SW480, ce qui indique une possible activation de cette voie. L'augmentation de l'expression de gènes cibles de la voie Wnt tels que CD44 et C-Myc a aussi été constaté dans les deux lignées cellulaires. La carnosine a démontré une capacité à induire la réversion de l'activation de la voie Wnt, en inhibant partiellement l'expression des gènes cibles de cette voie.

Ces résultats suggèrent que le MG pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'activité de la voie Wnt, favorisant potentiellement la prolifération des cellules cancéreuses dans le contexte du CRC. Les perspectives thérapeutiques offertes par la modulation du stress de glycation, en particulier via des agents comme la carnosine, sont prometteuses et méritent des études plus approfondies pour évaluer leur efficacité clinique.

Jeunehomme, L. (Septembre 2024), Rôle du méthylglyoxal dans les cellules du cancer colorectal via la voie de signalisation Wnt (mémoire). Promotrice : Pr. Akeila Bellahcène. Laboratoire de recherche sur les métastases (LRM), GIGA Cancer, ULiège.

Liste d'abréviations

AAR	Acid Amine Repeat
AG	Aminoguanidine
AGEs	Advanced Glycation End-products
AKR1B10	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10
AKT	Protein Kinase B
ALDHs	Aldehyde Dehydrogenases
ALDH1A1	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARM	Armadillo Repeat Motif
ATP	Adenosine Triphosphate
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	Bovine Serum Albumin
C-Met	Hepatocyte Growth Factor Receptor
C-Myc	Avian Myelocytomatosis Virus Oncogene Cellular Homolog
CD44	Cluster of Differentiation 44
CK1α	Casein Kinase 1 alpha
CRC	Colorectal cancer
CTNNB1	Catenin Beta A
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DHAP	Dihydroxyacetone Phosphate
DJ-1 / PARK7	Parkinsonism Associated Deglycase
EB1	End-Binding Protein 1
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
F1,6BP	Fructose 1,6-bisphosphate
FAP	Familial Adenomatous Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fzd	Frizzled
GAP	Glyceraldehyde 3-Phosphate
GLIS2	Gli-similar 2
GLO1	Glyoxalase 1
GLO2	Glyoxalase 2
GLO3	Glyoxalase 3
GLUT1	Glucose Transporter 1
GSH	Glutathion (réduit)
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HK2	Hexokinase 2
HSP	Heat Shock Protein
IC50	Concentration Inhibitrice à 50%
IF	Immunofluorescence
IP	Immunoprecipitation
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1

LRP	Low-density Lipoprotein Receptor-Related Proteins
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCR	Mutation Cluster Region
MG	Méthylglyoxal
MG-Hs	Methylglyoxal-derived Hydroimidazolone
MICA	Mercaptomethylimidazole Crosslink between Arginine and Cysteine
MODIC	Methylglyoxal-derived Lysine-Arginine Crosslink
MOLD	Methylglyoxal-lysine Dimer
PFA	Paraformaldéhyde
PFK2	Phosphofruktokinase 2
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
p-H2A.X	Phosphorylated Histone H2AX
P53	Tumor Protein p53
PVDF	Polyvinylidène Fluoride
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End-products
RNA	Acide ribonucléique
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAMP	Axin binding motif (Serine, Alanine, Methionine, Proline motif)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SSAO	Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase
TBS-T	Tris-Buffered Saline with Tween 20
TCF4	Transcription Factor 4
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless/Integrated (voie de signalisation)
WNT	Wnt Family Member
YAP	Yes-Associated Protein

Table des matières

I. Introduction	1
I.1. Cancer et métabolisme	1
I.2. Le méthylglyoxal (MG) : formation, modifications protéiques, détoxification et neutralisation	5
I.2.1. Formation du MG	5
I.2.2. Glycation médiée par le MG.....	6
I.2.3. Enzymes de détoxification du MG.....	8
I.2.4. Agents neutralisants du MG.....	10
I.3. Cancer colorectal (CRC)	11
I.3.1. Introduction	11
I.3.2. Modèle de Fearon et Vogelstein	11
I.4. Le gène Adenomatous Polyposis Coli (APC).....	13
I.5. KRAS	14
I.6. La voie de Wnt.....	16
I.6.1. Activation de la voie Wnt par liaison de son ligand	16
I.6.2. C-Met : un intervenant dans l'activation de la voie Wnt	20
I.7. Choix des lignées cellulaires	21
I.8. But du Mémoire	26
II. Matériel et méthodes.....	28
II.1. Culture cellulaire	28
II.1.1. Lignées utilisées et leurs caractéristiques	28
II.1.2. Manipulation des cellules	28
II.1.3. Traitements.....	29
II.2. Western blot	29
II.2.1. Extraction des protéines	29
II.2.2. Dosage des protéines	29
II.2.3. Composition et préparation des gels	30
II.2.4. Préparation des échantillons pour SDS-PAGE.....	30
II.2.5. Migration protéique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	31
II.2.6. Electrotransfert sur une membrane de fluor de polyvinylidène (PVDF).....	31
II.2.7. Blocage des sites de liaison non spécifiques	31

II.2.8. Immunodétection	31
II.2.9. Révélation	33
II.2.10. Normalisation	33
II.3. Immunofluorescence pour la détection des antigènes cibles	33
II.4. Concentration inhibitrice à 50%.....	35
II.5. Immunoprécipitation des protéines d'intérêt.....	36
III. Résultats.....	38
III.1. Niveau de bases dans différentes lignées cellulaires	38
III.2. Caractérisation de la sensibilité des lignées de CRC au méthylglyoxal.....	39
III.2.1. Calcul des concentrations inhibitrices 50 (IC50) sur les lignées HT29 et SW480.....	39
III.2.2. Détection des adduits du MG après apport exogène de MG	40
III.3. Expression des enzymes de détoxification principales du MG post-traitement au MG exogène.....	41
III.4. Exploration de la voie de signalisation Wnt	43
III.4.1. Détection de la β -caténine par Immunofluorescence au niveau des cellules de CRC	43
III.4.2. Détection de la β -caténine par Western blot au niveau des cellules de CRC en présence de MG.....	46
III.4.3. Détection des gènes cibles de la voie Wnt.....	47
III.5. Capacité des agents neutralisants du MG à inverser les effets du traitement MG exogène	50
III.5.1. Carnosine.....	50
III.5.2. Aminoguanidine	52
III.6. Mécanismes de l'induction de la β -caténine au niveau des cellules de CRC	55
III.6.1. Induction de C-met : un inhibiteur de GSK3.....	55
III.6.2. Augmentation de la β -caténine par glycation au niveau des cellules de CRC ?	55
IV. Discussion.....	58
V. Bibliographie.....	i

I.Introduction

I.1.Cancer et métabolisme

Les cellules nécessitent une énergie constante pour maintenir l'homéostasie du corps et soutenir des processus vitaux tels que la génération de gradients de concentration et la réparation de l'ADN. Dans les cellules en prolifération, ces besoins énergétiques augmentent pour permettre la croissance et la division. En conditions aérobies, les tissus différenciés métabolisent le glucose en pyruvate via la glycolyse. Ce pyruvate est ensuite oxydé dans les mitochondries pour produire du CO₂ et de l'ATP par phosphorylation oxydative, générant environ 36 molécules d'ATP par molécule de glucose et produisant peu de lactate (Figure 1). Lorsque l'oxygène est limité, les cellules réorientent le pyruvate vers la production de lactate via la glycolyse anaérobie, ce qui permet à la glycolyse de se poursuivre, mais avec une production d'ATP réduite à seulement 2 molécules par molécule de glucose et une plus forte production de lactate (Figure 1) ¹.

Le cancer, caractérisé par une prolifération cellulaire incontrôlée, pousse les cellules à adopter des stratégies métaboliques distinctes pour satisfaire leurs besoins accrus en énergie et en biosynthèse. Contrairement aux cellules normales qui reposent principalement sur la phosphorylation oxydative mitochondriale, les cellules cancéreuses privilégient un autre mécanisme : la glycolyse aérobie, un processus mis en lumière par Otto Warburg (Lauréat du prix Nobel de médecine en 1931). Warburg a observé que, même en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses convertissent majoritairement le glucose en lactate (Figure 1). Ce phénomène, d'abord interprété comme un signe de dysfonctionnement mitochondrial, est désormais reconnu comme une adaptation métabolique orchestrée par des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs. Bien que la glycolyse aérobie soit moins efficace que la phosphorylation oxydative, ne générant qu'environ 4 molécules d'ATP par molécule de glucose, elle reste une voie métabolique prédominante dans les cellules cancéreuses (Figure 1) ¹.

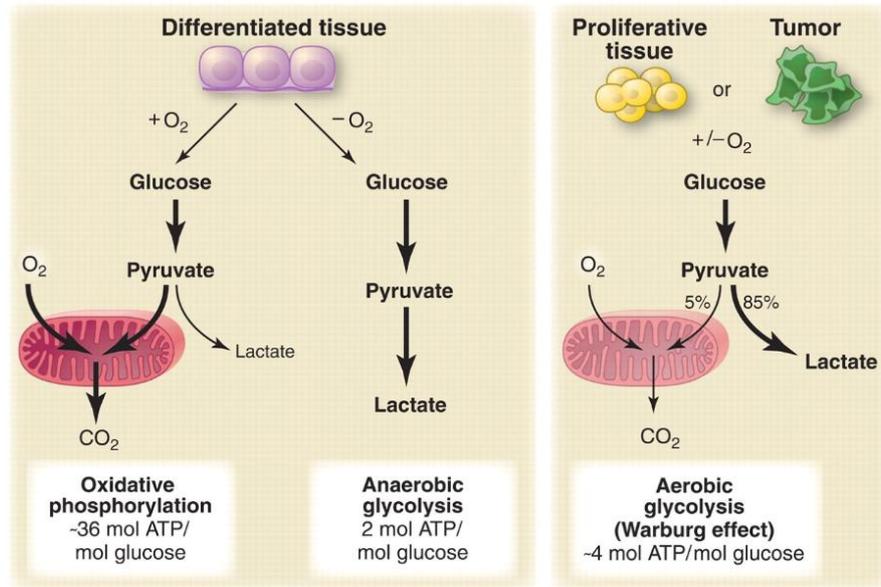


Figure 1 : Comparaison du métabolisme énergétique dans les tissus différenciés et prolifératifs, incluant les cellules tumorales. Dans les tissus différenciés (à gauche), en présence d'oxygène, le glucose est principalement métabolisé par phosphorylation oxydative grâce à l'aide des mitochondries. En absence d'oxygène, il se produit la glycolyse anaérobie. Dans les tissus prolifératifs et tumoraux (à droite), même en présence d'oxygène, le glucose est majoritairement converti en lactate par la glycolyse aérobie, réalisé par ¹.

L'augmentation de la glycolyse dans les cellules cancéreuses entraîne une production accrue de méthylglyoxal (MG), un sous-produit réactif de cette voie métabolique. Au cours de la glycolyse, le glucose est transformé en fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP), qui est ensuite divisé en deux trioses phosphates : le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP), sous l'action de l'enzyme aldolase (Figure 2). Le GAP poursuit la voie glycolytique pour être converti en pyruvate, tandis que le DHAP peut être isomérisé en GAP, assurant ainsi la continuité du flux glycolytique. Le MG est principalement généré à partir de ces trioses phosphates (DHAP et GAP). Ces intermédiaires glycolytiques, le DHAP et le GAP, peuvent subir des transformations non enzymatiques, incluant un réarrangement chimique et une déphosphorylation spontanée. Par conséquent, l'hyperactivité glycolytique observée dans les cellules cancéreuses conduit à une production excessive de MG (Figure 2) ².

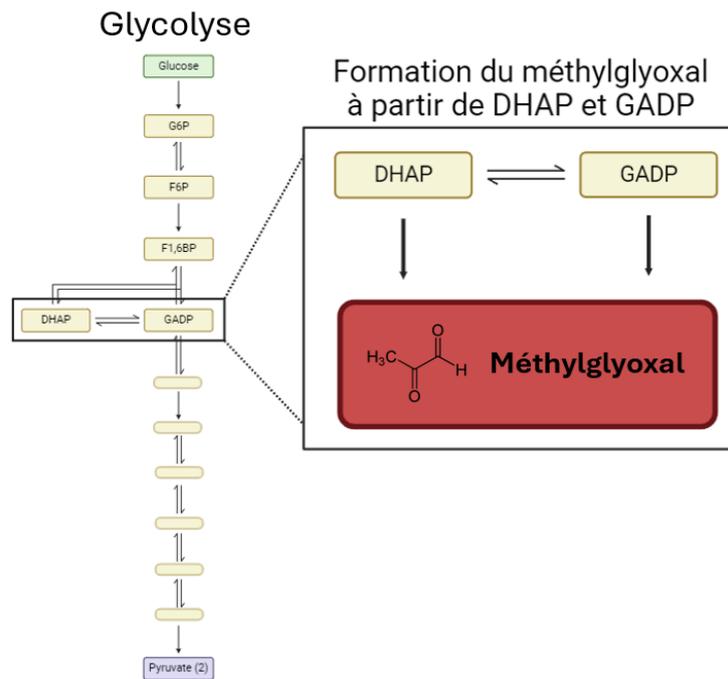


Figure 2: Formation du méthylglyoxal (MG) à partir de deux des intermédiaires de la glycolyse. Les intermédiaires de la glycolyse, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GADP), peuvent se réarranger et subir une déphosphorylation non enzymatique, conduisant à la formation spontanée de méthylglyoxal. Schéma réalisé sur BIORENDER.

Le MG, en tant que dicarbone réactif, possède une capacité de glycation beaucoup plus élevée que le glucose, ce qui lui permet de modifier de manière non enzymatique les protéines, l'ADN et les lipides. Cette glycation non enzymatique entraîne la formation de produits de glycation avancée (AGEs, Advanced Glycation End Products), des composés impliqués dans diverses pathologies, telles que le vieillissement, le diabète, les maladies cardiovasculaires et le cancer ³. Le stress glycant fait référence aux dommages causés par la glycation, un processus non enzymatique où des sucres réagissent avec des protéines. Le MG, en particulier, réagit avec certains acides aminés afin de former des adduits protéiques comme les argpyrimidines et les dihydroxy-imidazoles (MG-Hs). Ces adduits modifient la fonction et la structure des protéines affectées, pouvant altérer leur activité biologique et induire un stress glycant au sein de la cellule. En conséquence, les protéines glyquées par le MG peuvent présenter une stabilité ou une activité altérée ². En parallèle, le stress dicarbone, qui est un sous-ensemble du stress glycant, se concentre spécifiquement sur les effets des dicarbonyles réactifs, comme le MG, le glyoxal et la 3-désoxyglucosone (3-DG) (Figure 3). Ces composés, tels que le glyoxal, sont principalement produits par la dégradation oxydative du glucose et la fragmentation des bases de Schiff (intermédiaires réversibles formés par la réaction entre un groupe carbonyle et une amine) et des produits d'Amadori (issus du réarrangement des bases

de Schiff), modifie les résidus de lysine et d'arginine des protéines, formant également des AGEs. Quant à la 3-DG, elle se forme par déshydratation des produits d'Amadori lors de la glycation des protéines et directement à partir du glucose par des réactions non enzymatiques. Ces dicarbonyles réactifs, en s'accumulant, entraînent des dommages aux protéines, à l'ADN et aux lipides, renforçant ainsi le stress dicarbonyl dans les cellules. Les AGEs et le stress dicarbonyl peuvent interagir avec des récepteurs spécifiques comme RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), activant des voies de signalisation qui favorisent la survie cellulaire, la prolifération et l'invasion tumorale. Ces processus peuvent inhiber les voies apoptotiques, rendant les cellules cancéreuses plus résistantes à la mort cellulaire programmée, ce qui est un facteur clé de leur agressivité et de leur résistance aux traitements ⁴.

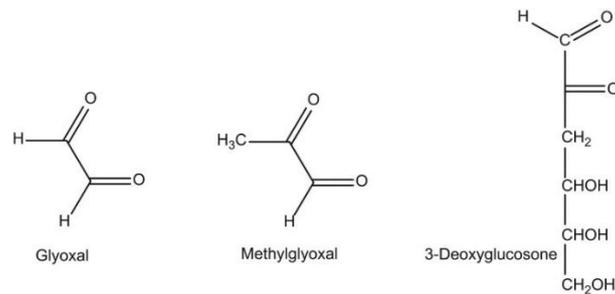


Figure 3: Principales espèces réactives de carbonyle impliquées dans le stress glycant : les structures chimiques du glyoxal, du méthylglyoxal, et du 3-désoxyglucosone sont représentées. Ces composés, connus sous le nom de dicarbonyles réactifs, jouent un rôle clé dans la formation des produits de glycation avancée (AGEs) lors du stress glycant, réalisé par ⁵.

I.2. Le méthylglyoxal (MG) : formation, modifications protéiques, détoxification et neutralisation

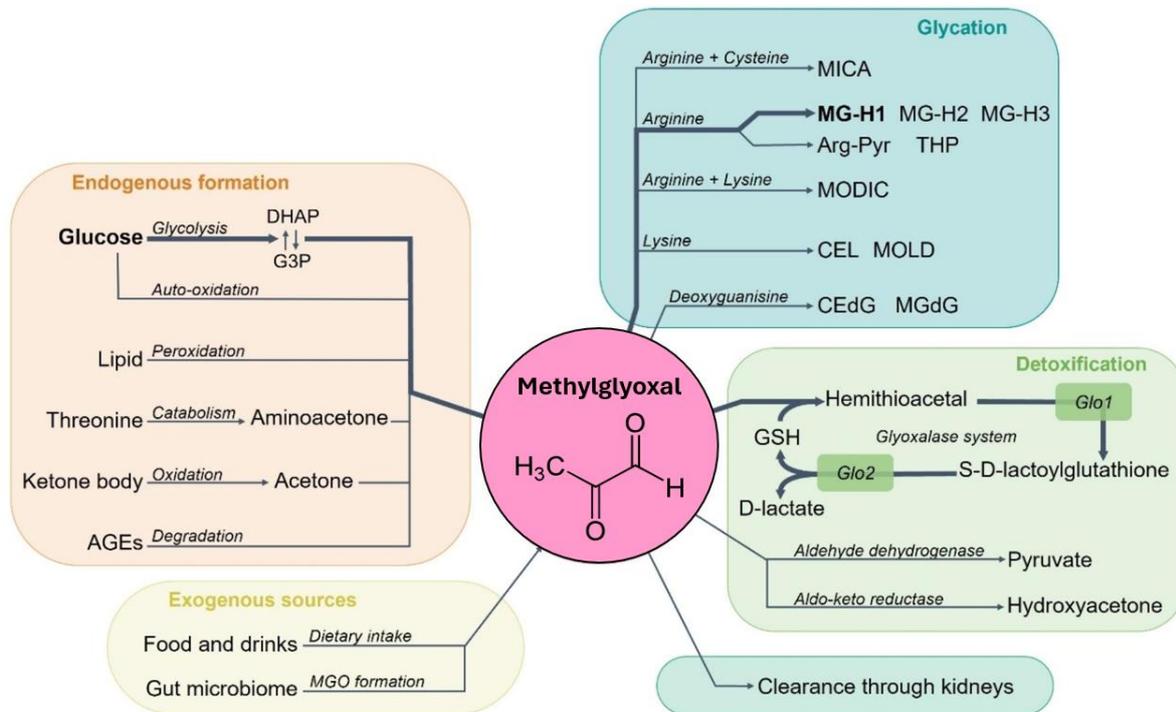


Figure 4: Schéma général des origines, transformations, adduits de glycation et voies de détoxification du MG. Schéma récapitulatif des sources, transformations, adduits de glycation et voies de détoxification du méthylglyoxal (MG). Les flèches indiquent les différentes origines endogènes et exogènes du MG, les adduits résultants et les principales voies de détoxification impliquant le système glyoxalase et l'élimination rénale, réalisé par ⁶.

I.2.1. Formation du MG

Le MG est un électrophile abondant formé à partir du métabolisme des lipides, des protéines et du glucose à des niveaux intracellulaires de 1 à 4 μM ⁷. C'est un dicarbonyl réactif qui peut être formé de manière endogène par plusieurs voies différentes. Comme vu précédemment, il est issu principalement de la glycolyse, émergeant spontanément à partir du phosphate de DHAP et du G3P (Figure 2) par des réactions non enzymatiques. Ce composé est également produit par divers mécanismes biochimiques tels que l'auto-oxydation du glucose en condition de stress oxydatif, la peroxydation des lipides, et le catabolisme de la L-thréonine par l'enzyme SSAO (Figure 5). D'autres voies endogènes incluent l'oxydation des corps cétoniques par la myéloperoxydase et de l'acétone par le cytochrome P450, processus exacerbés dans des conditions pathologiques comme la cétose et l'acidocétose diabétique (Figure 5). Outre ces sources internes, le MG peut être introduit dans l'organisme via l'alimentation, certains aliments contiennent naturellement des niveaux élevés de MG comme les noix ou le poisson (Figure 5).

De plus, le microbiote intestinal représente une source exogène notable : certaines bactéries pouvant synthétiser ce composé grâce à une MG synthase propre aux cellules procaryotes. Augmentant ainsi potentiellement les niveaux de MG, surtout dans des contextes de déséquilibre microbiotique ⁶.

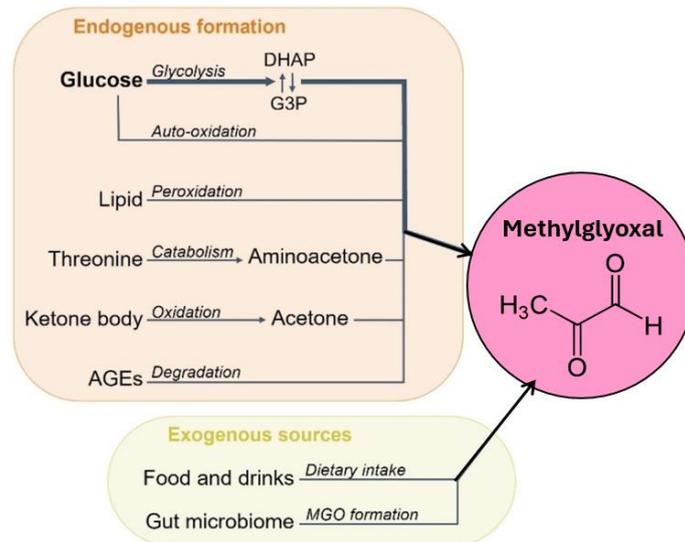


Figure 5: Origines endogènes et exogènes de la formation du MG. Ce schéma illustre les principales voies de formation du MG, un sous-produit de la dégradation du glucose et des protéines, ainsi que ses voies de détoxification, notamment par le système glyoxalase, adapté de ⁶.

Le MG peut également être formé par la réaction de Maillard et la lipoperoxydation, deux sources non-enzymatiques supplémentaires (Figure 5). La diversité de ces sources met en évidence l'importance des mécanismes de détoxification du corps pour prévenir les dommages cellulaires liés à l'accumulation de ce composé toxique. Une régulation stricte du MG est essentielle pour limiter ses effets nocifs, dont la formation de produits de AGEs ⁸.

I.2.2. Glycation médiée par le MG

Le MG modifie des acides aminés comme la lysine, l'arginine et la cystéine, formant des adduits protéiques qui impactent la structure et la fonction des protéines (Figure 6). Les concentrations physiologiques de MG modifient des protéines, produisant des dérivés fluorescents d'imidazole tels que MG-H1, MG-H2 et MG-H3. La modification des arginines produit des arpyrimidines (Figure 6). Ces adduits peuvent subir des modifications secondaires, entraînant la réticulation macromoléculaire, par exemple en formant des dimères protéiques lysine-lysine (MOLD) et lysine-arginine (MODIC) (Figure 6) ⁷. Le MG peut également réagir avec la désoxyguanosine, une composante de l'ADN, pour former le produit de glycation

MGdG (N2-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine), un adduit qui est impliqué dans les altérations structurelles de l'ADN. Enfin, le MG peut aussi former des liaisons croisées entre l'arginine et la cystéine, produisant des modifications comme les MICA (mercaptométhylimidazole croisé entre l'arginine et la cystéine).

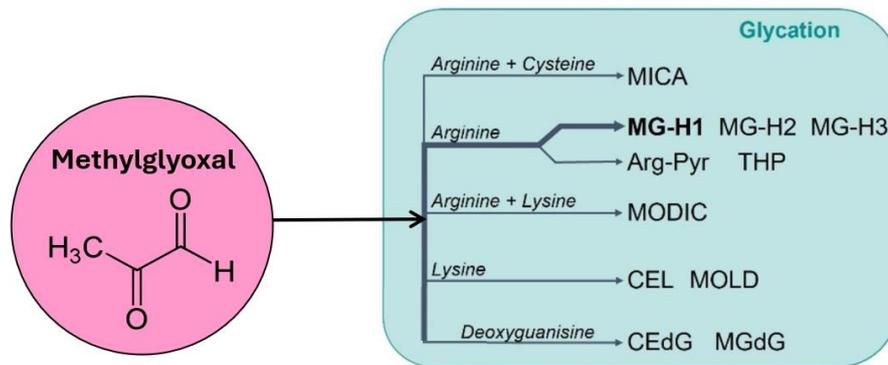


Figure 6: Produits de glycation formés par le MG. Le MG réagit avec divers résidus d'acides aminés tels que l'arginine, la lysine et la déoxyguanosine, conduisant à la formation de produits de glycation avancée (AGEs). Parmi ces produits, on trouve le MG-H1, MICA, MODIC, CEL, adapté de ⁶.

Les adduits formés par le MG peuvent entraîner des conséquences significatives sur la structure et la fonction des protéines, influençant divers processus cellulaires. En réponse à ce stress, les cellules activent des mécanismes de protection, dont l'induction des protéines chaperonnes, telles que les HSP (Heat Shock Proteins). Ces protéines jouent un rôle dans le maintien de la stabilité protéique en période de stress, et certaines, comme HSP27, sont spécifiquement modifiées post-traductionnellement par le MG. Les produits de glycation avancée (AGEs) générés par le MG peuvent avoir des effets variés sur les cellules cancéreuses, pouvant être pro- ou anticancéreux selon les conditions spécifiques et les concentrations. À faibles niveaux, ils favorisent la croissance et la survie des cellules cancéreuses en s'adaptant aux effets métaboliques altérés. À des niveaux élevés, ils induisent un stress toxique dépassant la capacité de détoxification de la tumeur. L'activation de RAGE, les récepteurs spécifiques aux AGEs, inhibe l'apoptose et favorise la croissance, l'inflammation et les métastases via des voies comme PI3K/AKT ⁹. Dans le contexte du cancer, un autre fait sur le MG est qu'il peut influencer l'activité de YAP (*Yes-associated protein*), un composant de la voie de signalisation Hippo ¹⁰. Le MG induit une accumulation de YAP dans le noyau des cellules cancéreuses, activant ainsi sa fonction de cofacteur transcriptionnel pro-cancer ¹¹.

I.2.3. Enzymes de détoxification du MG

La gestion du stress dicarboxylé dépend en partie de l'équilibre maintenu entre la formation et la détoxification du MG. Cette détoxification joue donc un rôle dans la prévention des dommages cellulaires et la progression tumorale ¹².

I.2.3.1. Le système des glyoxalases

Le système glyoxalase est présent dans le cytoplasme, et parfois dans le noyau, de toutes les cellules de mammifères. Il joue un rôle dans la détoxification du MG. Ce système comprend principalement deux enzymes : la glyoxalase 1 (GLO1) et la glyoxalase 2 (GLO2), ainsi que le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur. Ensemble, ils catalysent la conversion du MG en D-lactate via un intermédiaire, le S-D-lactoylglutathione, assurant ainsi la protection des cellules contre les effets néfastes du MG (Figure 7) ¹².

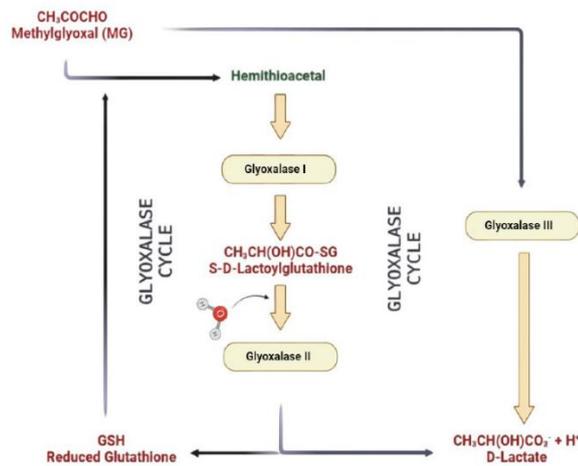


Figure 7: Le système glyoxalase et la détoxification du MG Fonctionnement du système glyoxalase dans la détoxification du méthylglyoxal (MG), montrant la conversion du MG en D-lactate via le cycle glyoxalase impliquant GLO1 et GLO2, ainsi que la détoxification alternative par la GLO3, réalisé par ¹².

GLO1 catalyse la formation de S-D-lactoylglutathione à partir du MG et du GSH (Figure 7). L'activité de GLO1 peut être modulée par des modifications post-traductionnelles, telle que la phosphorylation, qui influencent son fonctionnement. Par exemple, la phosphorylation de GLO1, induite par le $\text{TNF-}\alpha$ via la protéine kinase A (PKA), peut conduire à une mort cellulaire dépendante des caspases accompagnées par une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La surexpression de GLO1 dans les cellules cancéreuses leur permet de survivre en réduisant l'accumulation toxique de MG ¹². GLO2 complète le processus de détoxification en hydrolysant le S-D-lactoylglutathione en D-lactate, régénérant ainsi le GSH (Figure 7). En plus des enzymes GLO1 et GLO2, une enzyme appelée

glyoxalase 3 (GLO3) a été identifiée. GLO3, également connue sous le nom de DJ-1, convertit directement le MG en D-lactate sans nécessiter de GSH comme cofacteur (Figure 7). DJ-1 appelée aussi PARK7 (*Parkinsonism associated deglycase*) est associée aux maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ¹².

D'autres enzymes telles que les aldo-kéto réductases (AKRs) et les aldéhydes déshydrogénases (ALDHs) peuvent jouer un rôle compensatoire dans la détoxification du MG. Nous allons continuer en développant davantage ces autres enzymes (Figure 8) ¹³.

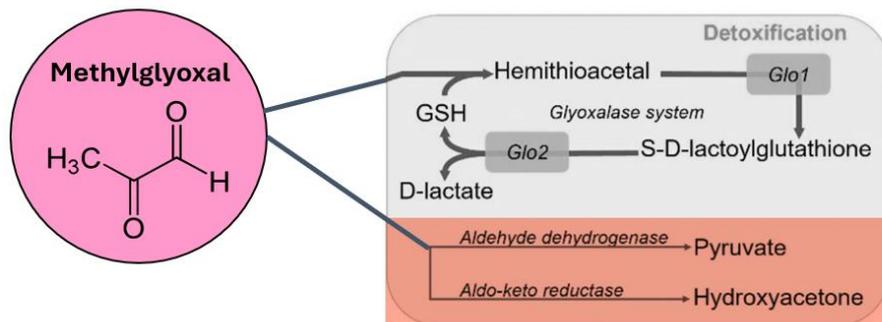


Figure 8 : Voies supplémentaires de détoxification du MG dans les cellules. En plus du système glyoxalase (GLO1 et GLO2), qui convertit le méthylglyoxal (MG) en D-lactate, d'autres enzymes jouent un rôle dans la détoxification du MG. L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) oxyde le MG en pyruvate réduisant ainsi sa toxicité. Par ailleurs, l'aldo-céto réductase (AKR) réduit le MG en hydroxyacétone, adapté de ⁶.

1.2.3.2. Les aldo-kéto réductases (AKRs)

Les AKRs jouent un rôle dans la détoxification du MG. Cette enzyme catalyse la réduction du MG en hydroxyacétone, diminuant ainsi sa concentration toxique et limitant la formation de AGEs et les dommages cellulaires associée (Figure 8). Les cellules cancéreuses utilisant intensivement la glycolyse pour leur croissance rapide produisent des quantités accrues de MG. L'AKR1B10, un membre de cette famille, contribue à neutraliser cet excès. Des inhibiteurs spécifiques comme l'acide oléanolique et le sulindac sont en développement, visant à augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements en entravant leur capacité à détoxifier le MG et en limitant ainsi la progression tumorale ¹⁴. En cas de déficit en GLO1, les AKR, notamment l'AKR1B3, augmentent leur activité enzymatique afin de compenser ce déficit ¹³.

1.2.3.3. Les Aldéhydes Déshydrogénases (ALDHs)

Les ALDHs sont une superfamille d'enzymes pour le métabolisme des aldéhydes, empêchant leur accumulation toxique et maintenant l'homéostasie cellulaire. Cette enzyme

catalyse la réduction du MG en pyruvate (Figure 8). Parmi elles, ALDH1, ALDH2 et ALDH3 détoxifient divers aldéhydes. Bien que les 2-oxoaldéhydes, tels que le MG, soient moins efficacement métabolisés en raison de leur hydratation complète à pH physiologique, les ALDHs contribuent tout de même à leur détoxification, jouant ainsi un rôle complémentaire dans la protection cellulaire ¹⁵.

I.2.4. Agents neutralisants du MG

Ces molécules jouent un rôle complémentaire aux enzymes de détoxification en neutralisant directement le MG et en empêchant la formation des AGEs.

I.2.4.1. La carnosine

La carnosine est un dipeptide composé de β -alanine et de L-histidine, présent naturellement dans de nombreux organismes. Elle est largement reconnue pour ses propriétés antioxydantes et antiglycation, jouant un rôle dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs et la formation de AGEs. La carnosine réagit directement avec le MG et d'autres composés carbonylés réactifs pour former des adduits, diminuant ainsi leur capacité à interagir avec des biomolécules comme les protéines et l'ADN. Cette réaction est facilitée par les groupes amino libres de la β -alanine et l'anneau imidazole de l'histidine présents dans la carnosine. En se liant aux composés carbonylés réactifs, la carnosine inhibe la formation des AGEs, qui sont des marqueurs de dommages chroniques et de vieillissement cellulaire. Cela est particulièrement pertinent pour des maladies chroniques comme le diabète et les troubles neurodégénératifs, où la formation d'AGEs joue un rôle pathogénique majeur. La carnosine se distingue par sa capacité à piéger efficacement les réactifs dicarboxylés comme le MG, tout en étant moins toxique que d'autres agents antiglycation. Sa capacité à réagir avec les composés réactifs et à inhiber la formation des AGEs en fait un candidat prometteur pour des applications thérapeutiques visant à atténuer les effets du stress oxydatif et des dommages glycatifs. La poursuite des recherches sur la carnosine pourrait offrir de nouvelles perspectives dans le traitement de maladies associées au vieillissement et aux déséquilibres métaboliques ¹⁶.

I.2.4.2. L'aminoguanidine

L'aminoguanidine (AG) est un puissant agent thérapeutique principalement étudié pour son rôle dans la prévention de la formation des produits finaux de glycation avancée (AGEs). Le mécanisme d'action de l'AG implique la réaction rapide avec les composés α,β -dicarboxylés tels que le MG, le glyoxal et le 3-déoxyglucosone, empêchant ainsi la formation des AGEs. Ces

réactions aboutissent à la formation de dérivés 3-amino-1,2,4-triazine substitués. L'AG manifeste ses propriétés anti-glycation par le biais de son groupe hydrazine nucléophile (-NHNH₂) et du groupe guanidino dirigé vers les dicarbonyls (-NH-C(=NH)-NH₂)¹⁷.

I.3.Cancer colorectal (CRC)

Le cancer colorectal, marqué par des altérations métaboliques, notamment une suractivité glycolytique, est un contexte propice à l'accumulation de MG ¹⁸.

I.3.1.Introduction

Le cancer colorectal (CRC) est l'un des cancers les plus répandus dans le monde, représentant la troisième forme de cancer la plus fréquente et la quatrième cause de décès par cancer, totalisant environ 8,5 % des décès liés au cancer. L'incidence du CRC est généralement plus élevée chez les hommes que chez les femmes, une différence qui pourrait s'expliquer par divers facteurs, dont un dépistage plus fréquent chez les femmes et les effets protecteurs des hormones stéroïdes féminines. D'ici 2030, on prévoit une augmentation significative des cas de CRC, avec plus de 2,2 millions de nouveaux cas et 1,1 million de décès à l'échelle mondiale ¹⁹.

Le CRC se développe généralement à travers un processus connu sous le nom de séquence d'adénocarcinome, débutant par des changements dans l'épithélium colique, la couche de cellules qui tapisse l'intérieur du gros intestin. Ces modifications peuvent initialement conduire à la formation de polypes adénomateux, des masses cellulaires généralement bénignes, qui se développent sur la muqueuse du gros intestin. Cependant, au fil du temps, certains de ces polypes peuvent subir des mutations génétiques supplémentaires qui les rendent susceptibles de se transformer en tumeurs malignes. Ces polypes adénomateux peuvent alors évoluer en adénocarcinomes, un type de cancer particulièrement agressif et la forme la plus courante de cancer colorectal ¹⁹. Cette transformation ne se produit pas dans tous les polypes, et plusieurs facteurs, y compris génétiques, jouent un rôle dans la détermination de quels polypes deviendront cancéreux. La détection précoce des polypes par des examens réguliers, tels que la coloscopie, est important pour prévenir le développement du cancer colorectal ²⁰.

I.3.2.Modèle de Fearon et Vogelstein

Le modèle de Fearon et Vogelstein offre un aperçu des étapes de génétiques et épigénétiques nécessaires à la transformation d'une cellule normale en tumeur maligne, mettant en avant les mécanismes moléculaires de la progression du cancer colorectal. Ce modèle

présente le développement du CRC comme un processus progressif, nécessitant au moins sept mutations distinctes pour évoluer vers une tumeur maligne (Figure 9)²¹. Cette hypothèse est largement validée par des études qui caractérisent précisément la séquence d'événements génétiques²⁰.

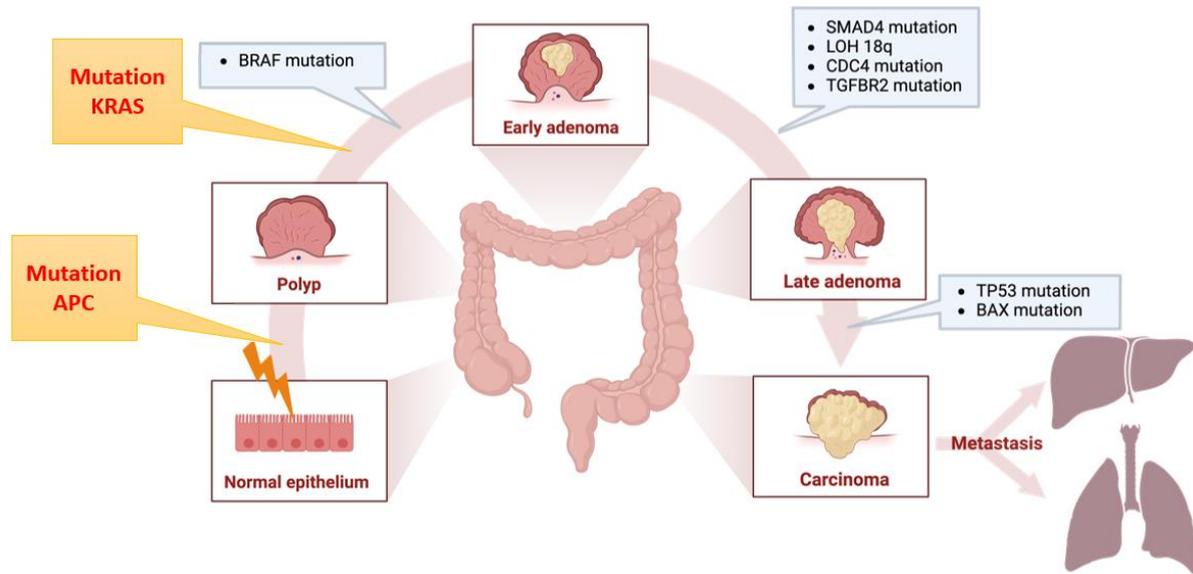


Figure 9: L'épithélium normal évolue en métastases sous l'effet de mutations dans des gènes. Schéma de la transformation de l'épithélium normal en métastases dans le cancer colorectal, illustrant les étapes clés et les mutations impliquées, notamment celles des gènes APC et KRAS, réalisé sur BIORENDER.

Première Étape : Transformation de la cellule normale en adénome (Figure 9)

- ❖ La mutation du gène APC : La perte de ce gène suppresseur de tumeurs marque l'un des premiers événements majeurs dans la formation d'adénomes, notamment déclenchée par une activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine. Cette activation est essentielle pour la prolifération cellulaire non régulée.
- ❖ Implication de KRAS : Les mutations de l'oncogène KRAS, souvent observées dans des adénomes plus développés, jouent un rôle dans la progression de l'adénome vers un état plus dysplasique. Ces mutations augmentent la prolifération cellulaire et soutiennent l'expansion des cellules, contribuant ainsi à une transformation plus avancée.

Deuxième Étape : Transformation de l'adénome en cancer (Figure 9)

- ❖ Acquisition de mutations supplémentaires : Cette phase implique l'acquisition de mutations additionnelles touchant tant des oncogènes que des gènes suppresseurs de tumeurs tels que la perte de p53 qui favorisent la progression vers la malignité.

- ❖ Progression vers la malignité : Les mutations supplémentaires permettent aux cellules adénomateuses d'acquérir la capacité de se dissocier, de migrer et de former des métastases, marquant la transition finale vers un carcinome.

Des efforts récents de séquençage du génome ont révélé jusqu'à 80 gènes mutés par tumeur colorectale. Toutefois, un groupe plus restreint de moins de 15 mutations a été identifié comme les principaux contributeurs à la tumorigenèse. Bien que ce modèle continue d'être étudié, plusieurs éléments semblent nécessaires : la nécessité de multiples impacts génétiques, l'existence d'intermédiaires distincts dans la progression vers le cancer, et l'importance de l'acquisition temporelle de ces changements génétiques. Les mutations d'APC servent d'événement déclencheur à la formation d'adénomes, tandis que l'activation mutationnelle de KRAS, en combiné avec la mutation de l'APC, peut promouvoir la progression tumorale ²².

Le schéma de la [Figure 9](#) illustre visuellement ce modèle, démontrant comment les interactions et les successions de mutations spécifiques guident la progression du cancer colorectal du stade initial jusqu'à la dissémination métastatique. Les mutations du gène APC et du gène KRAS sont parmi les altérations génétiques les plus prévalentes dans le cancer colorectal, affectant respectivement environ 30 à 70 % et 40 à 52 % des cas, jouant un rôle important dans l'initiation et la progression de cette maladie ²³.

1.4. Le gène Adenomatous Polyposis Coli (APC)

Le gène APC joue un rôle important en tant que suppresseur de tumeurs dans le cancer colorectal, principalement en régulant la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Cette voie est essentielle pour le contrôle de la prolifération cellulaire et la différenciation. Les mutations du gène APC, présentes dans environ 70 % des cancers colorectaux, constituent souvent l'un des premiers événements déclencheurs de la tumorigenèse. Ces mutations entraînent généralement une troncature de la protéine APC, ce qui altère sa capacité à réguler la dégradation de la β -caténine. En conséquence, la β -caténine s'accumule dans le noyau, où elle active de manière inappropriée des gènes cibles de Wnt, favorisant ainsi une prolifération cellulaire incontrôlée ²⁴.

Cependant, toutes les mutations d'APC n'ont pas le même impact sur la signalisation Wnt. La nature et la localisation spécifiques des mutations sur le gène APC déterminent en grande partie l'ampleur de l'activation de la voie Wnt et, par extension, la sévérité de la prolifération tumorale. Par exemple, les mutations situées dans la région de "cluster de

mutations" (MCR) entre les codons 1282 et 1581 sont particulièrement agressives, car elles abolissent la plupart des répétitions nécessaires à la régulation de la β -caténine tout en conservant une certaine fonctionnalité partielle du gène. Cette variabilité dans les mutations souligne l'importance de leur caractérisation précise dans le cadre du diagnostic et du traitement du cancer colorectal ²⁴.

I.5. KRAS

KRAS est un oncogène dont l'activation mutationnelle favorise une prolifération cellulaire incontrôlée. Elle aide normalement à la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire. Dans le modèle de Fearon et Vogelstein, KRAS intervient généralement après les altérations d'APC, contribuant à la transition de l'adénome bénin vers un état plus avancé et potentiellement malin. KRAS, faisant partie de la famille des gènes RAS. La protéine KRAS, en se liant au GTP, adopte une conformation active qui transmet des signaux impliqués dans la prolifération et la survie des cellules (Figure 10). Dans le cas sain, cette activation est temporaire, car KRAS possède une activité GTPase intrinsèque qui hydrolyse GTP en GDP, ramenant la protéine à un état inactif (Figure 10) ²³.

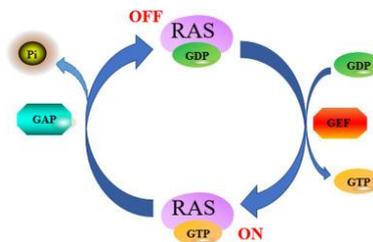


Figure 10: Régulation de l'activité de KRAS. Cycle d'activation et de désactivation de la protéine KRAS. Ce schéma illustre la régulation de l'activité de KRAS, une protéine essentielle dans la signalisation cellulaire. KRAS, lorsqu'elle est liée au GTP, est dans un état activé ("ON") et transmet des signaux de croissance et de survie aux cellules. L'hydrolyse du GTP en GDP, un processus intrinsèque à l'activité GTPase de KRAS, ramène la protéine à un état inactif ("OFF"). Dans le cas des mutations dans le gène KRAS, ce cycle est perturbé, maintenant la protéine dans un état activé de façon permanente, contribuant ainsi à la tumorigénèse, réalisé par ²³.

Cependant, les mutations dans le gène KRAS entraînent une activation permanente de la protéine KRAS, empêchant l'hydrolyse du GTP et maintenant KRAS dans un état activé de façon continue (Figure 11). Cela active plusieurs voies de signalisation, notamment la voie PI3K/AKT, qui joue un rôle central dans la promotion de la croissance tumorale et la survie cellulaire (Figure 11). AKT, à son tour, stimule des processus favorisant la survie des cellules tumorales, la croissance et l'inhibition de l'apoptose. Par conséquent, les mutations de KRAS

assurent une signalisation continue à travers PI3K/AKT, et qui contribue à la résistance des cellules cancéreuses aux traitements anticancéreux²³.

AKT, à son tour, inhibe GSK3, une kinase qui joue un rôle dans la dégradation de la β -caténine par le complexe de destruction lié à APC. Cette inhibition de GSK3 par AKT conduit indirectement à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine en empêchant la dégradation de la β -caténine. En conséquence, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme, migre vers le noyau, et active la transcription de gènes prolifératifs (Figure 11).

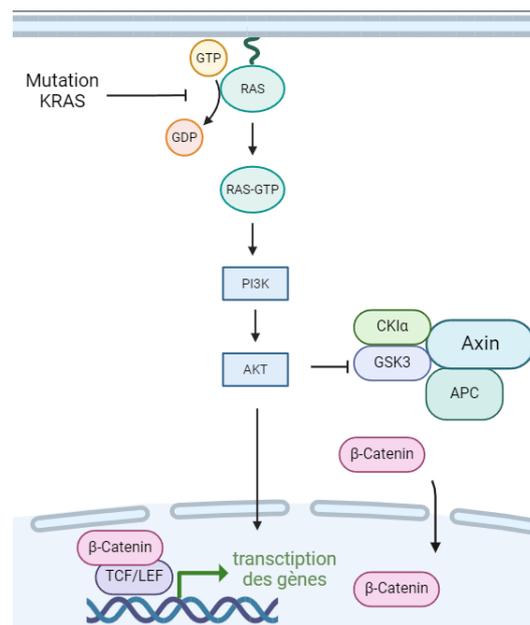


Figure 11: Impact de la mutation KRAS sur la voie PI3K/AKT et la signalisation Wnt/ β -caténine. Ce schéma montre que la mutation de KRAS entraîne une activation constitutive de la protéine RAS, qui reste liée au GTP et active en permanence les voies de signalisation PI3K/AKT. L'activation d'AKT conduit à l'inhibition de GSK3 β , une kinase impliquée dans la dégradation de la β -caténine. En conséquence, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme, transloque vers le noyau et active la transcription des gènes cibles de la voie Wnt, ce qui favorise la prolifération cellulaire et la progression tumorale, réalisé sur BIORENDER.

Les mutations du gène KRAS sont associées à un pronostic moins favorable chez les patients atteints de cancer colorectal, entraînant une survie plus courte par rapport aux patients avec un KRAS de type sauvage. Ces mutations provoquent un stress dicarboxylé accru en raison de l'activation de la voie AKT, qui renforce la glycolyse. Cette augmentation de la glycolyse conduit à une production accrue de MG, un sous-produit de cette voie métabolique. Le MG, à son tour, exacerbe le stress cellulaire et contribue à l'amplification des signaux pro-survie, établissant ainsi une boucle de rétroaction positive qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses mutées KRAS²⁵.

I.6. La voie de Wnt

Alors que la mutation du gène KRAS favorise une prolifération cellulaire accrue en activant des voies telles que PI3K/AKT et indirectement Wnt/ β -caténine, l'altération du gène APC joue un rôle en déclenchant directement une activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine.

- Voie canonique (ou classique) de Wnt/ β -caténine : APC fait partie d'un complexe de destruction qui régule les niveaux de β -caténine dans la cellule. En absence de signal Wnt, APC, en collaboration avec Axin, GSK3 β et CK1, participe à la phosphorylation de β -caténine, marquant ainsi cette dernière pour la dégradation par le protéasome. Lorsque le signal Wnt est activé, ce processus de dégradation est inhibé, permettant à la β -caténine de s'accumuler dans le cytoplasme et de transloquer dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles.
- Voies non canoniques de Wnt : Les voies non canoniques de Wnt, qui incluent notamment la voie planaire de polarité cellulaire (PCP) et la voie Wnt/Ca²⁺, agissent généralement indépendamment de la β -caténine et donc, par extension, indépendamment d'APC. Ces voies sont impliquées dans divers processus comme l'organisation cytosquelettique, la motilité cellulaire, et la morphogenèse tissulaire ²⁶.

I.6.1. Activation de la voie Wnt par liaison de son ligand

Nous allons exclusivement aborder la voie canonique de Wnt durant ce mémoire. Cette voie comprend quatre segments : le signal extracellulaire, le segment membranaire, le segment cytoplasmique et le segment nucléaire.

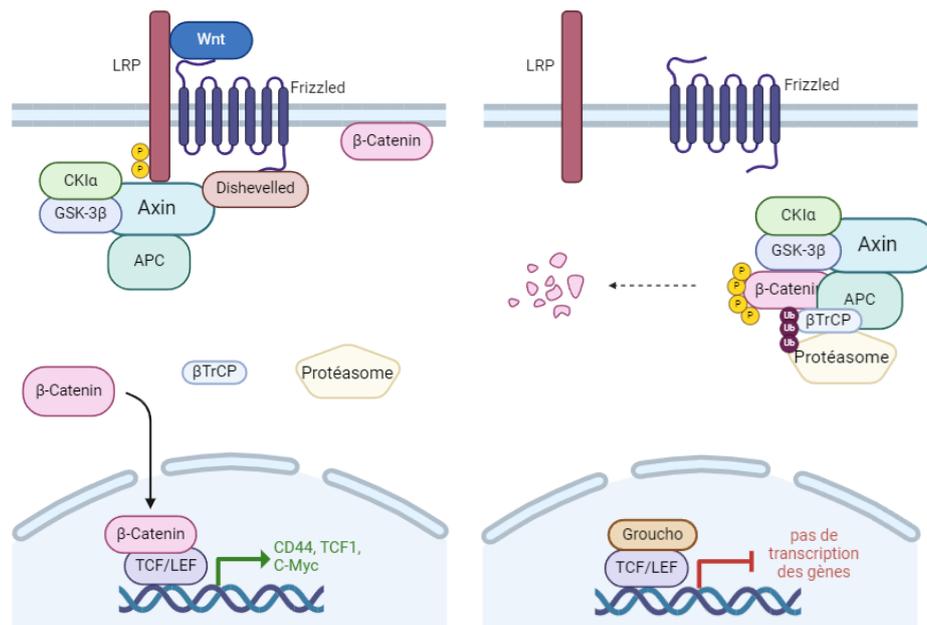


Figure 12: Voie de signalisation Wnt/ β -caténine et régulation de la transcription génique. À gauche, l'activation de Wnt provoque la phosphorylation d'Axin, la dissociation du complexe destructeur, et l'accumulation de la β -caténine dans le noyau, où elle active la transcription de gènes cibles. À droite, en l'absence de Wnt, la β -caténine est phosphorylée par GSK-3 β au sein du complexe destructeur, ce qui conduit à sa dégradation et à la répression de la transcription génique (voir détails dans le texte), réalisé sur BIORENDER adapté de ²⁷.

1.6.1.1. Composante extracellulaire

Les protéines Wnt, au nombre de 19 chez l'être humain, sont des ligands sécrétés qui jouent un rôle clé dans l'activation de la voie de signalisation Wnt ²⁶. Des études ont révélé que différentes classes de ligands Wnt signalent soit par la voie Wnt/ β -caténine soit par la voie Wnt/Ca²⁺, avec des implications fonctionnelles distinctes. Par exemple, certains Wnts comme Wnt1, Wnt3a, Wnt7a et Wnt8 activent la voie Wnt/ β -caténine, tandis que d'autres comme Wnt4, Wnt5a et Wnt11 stimulent la voie Wnt/Ca²⁺. Cependant, cette classification n'est pas absolue, car certains Wnts peuvent activer différentes voies en fonction des récepteurs présents à la membrane cellulaire. Par exemple, bien que Wnt5a soit classiquement associé à la voie Wnt/Ca²⁺, sa surexpression en combinaison avec un récepteur Frizzled (Fzd) spécifique peut activer la voie Wnt/ β -caténine ²⁷.

1.6.1.2. Segment membranaire

Dans la voie canonique de signalisation Wnt, les récepteurs sont des hétérodimères composés de récepteur Fzd et des protéines liées aux récepteurs du cholestérol à basse densité (LRP-5/6) (Figure 12). La liaison de Wnt conduit à la dimérisation des deux récepteurs et à un changement de conformation des récepteurs (Figure 12) ²⁶.

- Récepteurs Frizzled (Fzd) :

Frizzled est une famille de récepteurs transmembranaires qui, après la liaison avec les ligands Wnt, interagissent avec les protéines Dishevelled (Dvl) (Figure 12). Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire riche en cystéines essentiel pour la liaison avec Wnt, et un domaine intracellulaire qui recrute et active Dvl. Cette activation de Dvl est nécessaire à la propagation du signal vers les mécanismes intracellulaires qui régulent la dégradation de la β -caténine (Figure 12)²⁸.

- Récepteurs LRP-5/6 :

La famille des protéines liées aux récepteurs lipoprotéines de basse densités (LRP *Low-density Lipoproteine Receptor-Related Proteins*). LRP-5 et LRP-6 fonctionnent comme corécepteurs avec Fzd (Figure 12). Lorsque Wnt se lie à ce complexe récepteur, LRP est notamment phosphorylé par GSK3, ce qui renforce son interaction avec des éléments du segment cytoplasmique décrits plus bas (Figure 12).

1.6.1.3. Segment cytoplasmique

- Dishevelled :

- a) Recrutement et Activation : Dvl est recruté à la membrane plasmique suite à l'activation des récepteurs par les ligands Wnt (Figure 12)²⁹.
- b) Interaction avec Axin : La polymérisation de Dvl permet une interaction plus efficace avec Axin, grâce à une liaison hétérologue facilitée par le domaine DIX. Cette interaction est pour détourner Axin du complexe de destruction de la β -caténine, permettant ainsi l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation ultérieure dans le noyau (Figure 12)³⁰.
- c) Phosphorylation de LRP : Dvl favorise également la phosphorylation de la queue cytoplasmique de LRP5/6, renforçant ainsi le site d'accueil pour Axin (Figure 12). Cette étape améliore la proximité spatiale entre Axin et le complexe récepteur LRP, ce qui est essentiel pour l'inhibition efficace du complexe de destruction de la β -caténine (Figure 12)³¹.

- Le complexe de Destruction : un régulateur clef de la β -caténine

Dans le cytoplasme, le complexe de destruction régule les niveaux de β -caténine. Ce complexe comprend APC, AXIN, CK1 et GSK3 (Figure 12)²⁷.

AXIN, échafaudage central du complexe destructeur, lie et assemble les autres composants essentiels ce qui intensifie la phosphorylation de la β -caténine. APC, avec ses multiples sites de liaison pour la β -caténine et ses motifs d'amarrage pour AXIN, est nécessaire à la fonction du complexe. La β -caténine est phosphorylée séquentiellement par CK1 α (phosphorylation de S45) et GSK-3 (phosphorylation de T41, S37 et S33) (Figure 12). Cette phosphorylation est suivie de son ubiquitination par un complexe comprenant une E3 ligase (β -TrCP) qui va déclencher sa dégradation par le protéasome (Figure 12).

La fonction de ce complexe destructeur de la β -caténine est complètement modifiée lors de la liaison de Wnt à ses récepteurs. L'interaction entre Axin et les récepteurs LRP phosphorylés est particulièrement critique. Le complexe destructeur se voit déplacé à la membrane et n'est plus capable de phosphoryler la β -caténine et de conduire à sa destruction (Figure 12). En effet, la proximité entre le complexe destructeur et la membrane permet notamment de bloquer la poche catalytique de GSK3, déterminant ainsi l'état ON de la signalisation Wnt associé à la possibilité de translocation nucléaire de la β -caténine (Figure 12)³².

1.6.1.4. Segment nucléaire

Dans l'état off en l'absence de signal Wnt, Groucho agit comme un corépresseur transcriptionnel. Groucho se lie aux facteurs de transcription TCF/LEF associés à la β -caténine et inhibe l'expression des gènes cibles (Figure 12)³⁰.

Dans l'état ON, la voie Wnt mène à l'accumulation de β -caténine dans le noyau, où elle se lie aux facteurs de transcription TCF/LEF comme TCF4 ou LEF1 pour activer la transcription de gènes cibles spécifiques (Figure 12)³³. Lorsqu'elle est activée, la voie Wnt entraîne l'expression de plusieurs gènes cibles qui jouent des rôles cruciaux dans la cellule. Parmi ces gènes, CD44 est fréquemment activé et surexprimé, particulièrement dans les cancers où il est associé aux propriétés des cellules souches cancéreuses. Cette activation de CD44 par la signalisation Wnt augmente l'invasivité et la capacité de métastase des cellules cancéreuses, notamment dans le cancer colorectal. De plus, la voie Wnt active des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que cyclin D1 et Myc, qui sont essentiels pour la division cellulaire. Elle régule également l'expression de gènes de signalisation comme VEGF et FGF, qui sont impliqués dans la croissance et la différenciation des cellules. Enfin, bien que l'activation de

Wnt puisse promouvoir l'expression de certains gènes d'adhésion cellulaire, elle tend à réprimer E-cadhérine, facilitant ainsi la migration des cellules et contribuant potentiellement à la progression tumorale ³⁴. Des acteurs peuvent cependant intervenir à ce niveau afin d'inhiber cette activation, comme par exemple GLIS2 qui se lie à la β -caténine et empêche l'interaction entre la β -caténine et TCF/LEF ³⁵.

L'E-cadhérine, une molécule d'adhésion cellulaire, lie directement la β -caténine au niveau de la membrane plasmique, stabilisant ainsi cette dernière et empêchant sa translocation vers le noyau. En se liant à l'E-cadhérine, la β -caténine est protégée de la dégradation mais également de son rôle dans la signalisation nucléaire via le facteur LEF-1/TCF. En d'autres termes, la présence d'E-cadhérine empêche l'accumulation de β -caténine libre dans le cytoplasme, ce qui est nécessaire pour son rôle dans l'activation de la transcription des gènes cibles de Wnt. Par conséquent, la perte ou la diminution de l'expression d'E-cadhérine, souvent observée dans les cancers, conduit à une accumulation de β -caténine libre qui peut alors transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes pro-tumorigènes ³⁶.

I.6.2. C-Met : un intervenant dans l'activation de la voie Wnt

Comme nous parlons de l'activation de la voie Wnt, il est important de noter que cette activation peut être déclenchée non seulement par la liaison directe d'un ligand Wnt à ses récepteurs, mais aussi par d'autres voies de signalisation qui modulent l'activité des composants. Par exemple, bien que les mutations du gène APC soit important dans l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, le récepteur C-Met joue un rôle modulateur en inhibant GSK3 β via la voie PI3K/AKT (Figure 13). Cette inhibition renforce indirectement l'accumulation de β -caténine dans le cytoplasme, favorisant ainsi la signalisation Wnt. Des études ont montré que dans le cancer du côlon, l'expression de c-Met, un récepteur tyrosine kinase appartenant à la famille MET, peut améliorer la transduction du signal Wnt/ β -caténine en empêchant l'activité de GSK3 ce qui favorise la translocation de la β -caténine vers le noyau ³⁷.

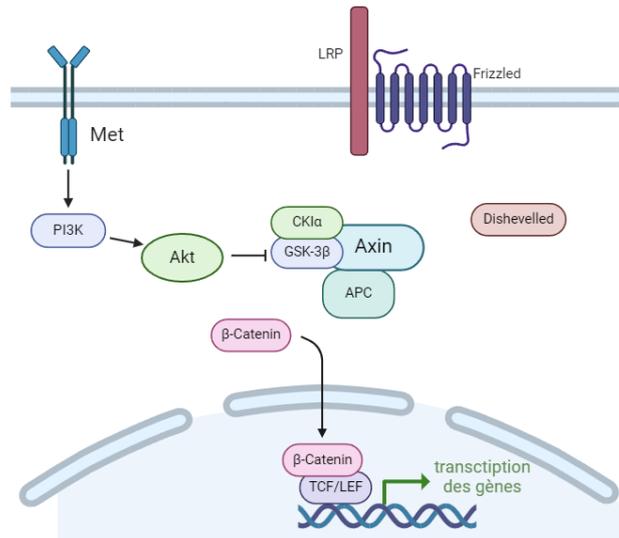


Figure 13: Interaction entre les voies de signalisation Wnt et PI3K/AKT dans la régulation de la transcription génique. Ce schéma illustre l'activation de la voie PI3K/AKT, souvent initiée par des récepteurs tels que C-Met. Cela peut moduler l'activité du complexe destructeur via l'inhibition de GSK-3 β , favorisant l'accumulation de la β -caténine et l'activation de la transcription génique, ce qui contribue à la prolifération cellulaire et à la progression tumorale, d'après réalisé sur BIORENDER.

I.7.Choix des lignées cellulaires

Pour guider notre choix des lignées cellulaires d'intérêt pour ce projet, nous nous sommes intéressés aux lignées présentant des différences de leur niveau basal d'activation de la voie Wnt. Notre choix pour explorer les effets potentiels du stress du MG exogène sur la voie Wnt s'est naturellement porté sur les cellules des lignées HT29 et SW480 présentant, respectivement, une activité Wnt modérée et élevée (figure 14).

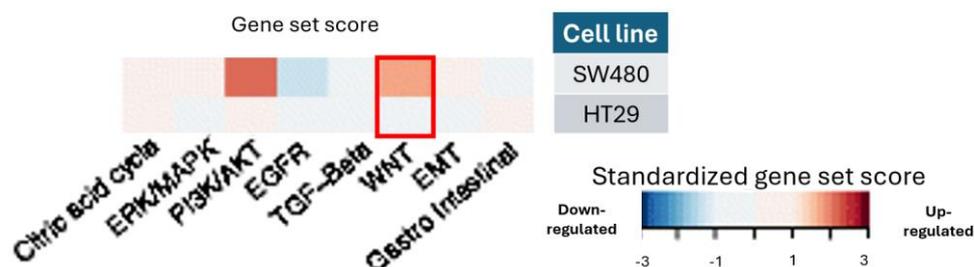


Figure 14: Aperçu des voies cellulaires majeures dans les lignées cellulaires HT29 et SW480. Heatmap comparatif des voies de signalisation dans les lignées cellulaires HT29 et SW480. Les scores génétiques standardisés indiquent une régulation à la hausse (en rouge) ou à la baisse (en bleu) des différentes voies. La voie Wnt est particulièrement régulée de manière différenciée entre les deux lignées, adapté de ³⁸.

Nous pouvons supposer que cette différence vient de leur mutation différente concernant APC qui activerait la voie Wnt à des degrés différents. Pour considérer cela, une explication approfondie des mutations APC dans le CRC est nécessaire. Environ deux tiers des tumeurs

colorectales acquièrent des mutations du gène APC, souvent considérées comme des événements initiateurs de la tumorigenèse. La Figure 15 illustre que les mutations du gène APC sont beaucoup plus fréquentes dans le CRC (49,8 %) que dans le cancer du sein (1,3 %). Cette disparité est également observée pour les mutations des gènes AXIN1, β -caténine, et TCF7L2 (TCF4), qui sont plus prévalentes dans le CRC que dans le cancer du sein. Cela montre que, bien que la voie Wnt soit impliquée dans plusieurs cancers, son impact et les mutations associées diffèrent considérablement selon le type de cancer. Ainsi, bien que nous nous concentrons sur APC, il est important de considérer la complexité et la diversité des mutations pouvant affecter la voie Wnt ³⁹.

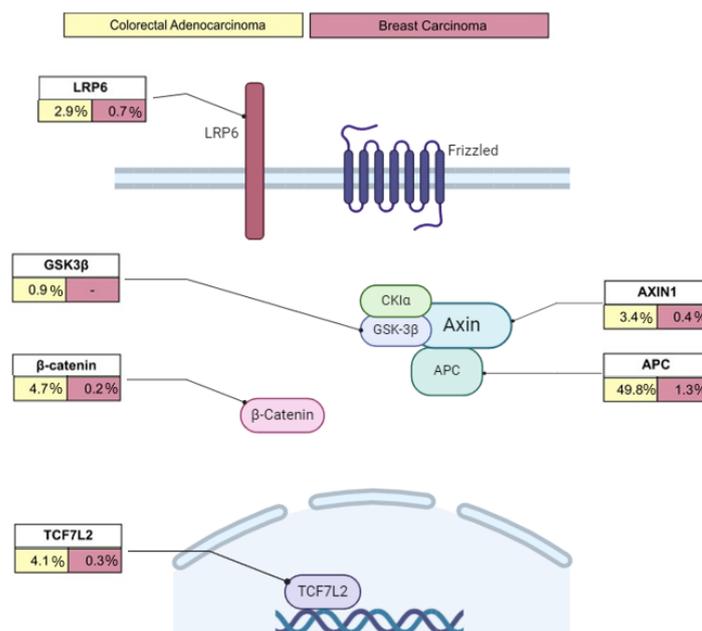


Figure 15: Taux de mutation des composants de la voie Wnt dans le carcinome colorectal (CRC) et le carcinome mammaire (cancer du sein). Ce schéma compare les taux de mutation des principaux composants de la voie de signalisation Wnt entre le carcinome colorectal (CRC) et le carcinome mammaire (cancer du sein). Les pourcentages indiquent la proportion de patients atteints de CRC ou de cancer du sein présentant des mutations dans certains gènes canoniques de la voie Wnt. Par exemple, les mutations du gène APC sont beaucoup plus fréquentes dans le CRC (49,8 %) par rapport au cancer du sein (1,3 %). De même, les mutations des gènes AXIN1, β -caténine, et TCF7L2 montrent une prévalence plus élevée dans le CRC comparé au cancer du sein, soulignant l'importance différentielle de la voie Wnt dans ces deux types de cancer, réalisé sur BIORENDER et adapté de ⁴⁰.

Les mutations APC sont diverses en fonction des lignées cellulaires et n'ont pas le même impact sur la signalisation de Wnt. Pour aider à la compréhension de ces différentes mutations, une présentation détaillée de la structure d'APC est nécessaire. Cette structure est représentée à la figure 16.

1. **Domaine des répétitions d'Armadillo (ARM)** : Situé vers l'extrémité N-terminale, il comprend des répétitions d'Armadillo importantes pour les interactions protéine-protéine. Elles permettent des interactions notamment avec l'Axin et à d'autres protéines cytosquelettiques.
2. **Répétitions de 15 acides aminés (15AAR Acid Amine Repeat)** : Ces répétitions sont impliquées dans la liaison à la bêta-caténine, aidant à réguler sa stabilité et sa localisation dans la cellule.
3. **Répétitions de 20 acides aminés (20AAR Acid Amine Repeat)** : Impliquées dans la liaison et la dégradation de la bêta-caténine, ces répétitions jouent un rôle central dans le contrôle de la signalisation Wnt.
4. **Répétitions SAMP (Axin binding)** : Ces séquences sont impliquées dans la liaison à Axin, un composant clé du complexe de destruction de la bêta-caténine, facilitant ainsi sa dégradation. SAM étant pour un motif répété de sérine, alanine, méthionine, proline.
5. **Domaine basique (microtubule binding)** : Ce domaine est important pour la liaison aux microtubules, influençant la structure du cytosquelette et la mitose.
6. **Sites de liaison pour EB1 et HDLG** : Ces sites facilitent l'interaction avec EB1 et la protéine homologue à Dishevelled, ligand du glycoprotéine (HDLG), affectant potentiellement la migration cellulaire et d'autres aspects de la dynamique cellulaire.

Dans le contexte du cancer colorectal, la majorité des mutations pathogènes d'APC tronquent la protéine avant la première répétition de SAMP, supprimant ainsi son site de liaison à Axin. Cette troncature entraîne la production d'une protéine APC stable mais tronquée, qui conserve généralement de 0 à 3 répétitions de 20 acides aminés, qui sont le motif de liaison à la β -caténine. La perte de ces interactions avec Axin et la β -caténine perturbe la dégradation normale de cette dernière, permettant à la β -caténine de s'accumuler dans le cytoplasme et de se transloquer dans le noyau ³⁹.

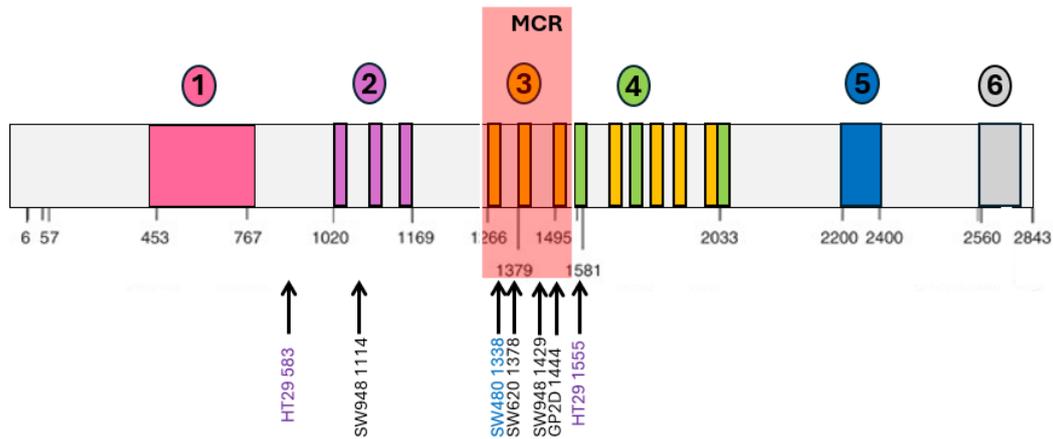


Figure 16: La région du groupe de mutations somatiques (codons 1282-1581) est mise en évidence. Cette Figure illustre la distribution des domaines fonctionnels de la protéine APC, voir description dans le texte pour les domaines 1, 2, 4, 5 et 6, ainsi que la localisation d'une région critique appelée Mutation Cluster Region (MCR), située entre les codons 1282 et 1581. Cette région (3) est particulièrement notable pour sa forte concentration de mutations somatiques observées dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses. Contrairement aux autres parties de la protéine APC, les mutations se concentrent spécifiquement dans la MCR, ce qui peut entraîner des conséquences sur la fonction de la protéine, notamment en perturbant la régulation de la β -caténine par les répétitions de 20 acides aminés (3). Les flèches montrent les positions spécifiques des mutations identifiées dans différentes lignées cellulaires, adapté de ⁴¹.

Les mutations qui se produisent dans la région de groupe de mutations (MCR : *Mutation Cluster Region*), couvrant les codons 1282 à 1581, sont particulièrement fréquentes (figure 16). Elles sont souvent accompagnées de la perte d'hétérozygotie ou d'autres mutations en amont de la MCR. Ces mutations conservent généralement une ou deux répétitions de 20AAR, tout en abolissant toutes les répétitions SAMP, ce qui exacerbe encore la dérégulation de la β -caténine et intensifie la signalisation Wnt. Cette dérégulation favorise la croissance tumorale en permettant à la β -caténine d'échapper à la dégradation et de participer activement à la transcription de gènes favorisant la prolifération cellulaire ³⁹.

Les lignées cellulaires de cancer colorectal présentent des comportements différents selon les mutations d'APC qu'elles portent. Par exemple, les cellules SW480, qui ne possèdent qu'une seule répétition de 20AAR, montrent une absence d'ubiquitination de la β -caténine, entraînant son accumulation excessive. Cette accumulation est due à l'incapacité de l'APC tronquée à recruter efficacement les composants du complexe de destruction, comme Axin, CK1 α et GSK3 β , nécessaires pour la phosphorylation et l'ubiquitination de la β -caténine. En revanche, les lignées HT29, qui conservent plusieurs répétitions de 20AAR, parviennent à maintenir une certaine régulation de la β -caténine par ubiquitination partielle. Cela illustre que la conservation de ces répétitions permet encore une certaine dégradation de la β -caténine, bien que de manière inefficace, ce qui limite quelque peu la prolifération incontrôlée ⁴². Ces

différences dans l'activation de la voie Wnt entre les différentes lignées cellulaires sont cruciales pour comprendre comment des mutations spécifiques d'APC influencent le comportement tumoral. Par exemple, dans les cellules SW480, l'absence d'une régulation efficace de la β -caténine pourrait expliquer un phénotype tumoral plus agressif comparé aux cellules HT29, où une régulation résiduelle existe encore. La théorie du "just-right" propose que la tumorigenèse est favorisée par un niveau spécifique de signalisation Wnt, plutôt que par une activation complète ou insuffisante. Contrairement à l'idée que les mutations d'APC sont aléatoires, cette théorie suggère que la position et le type de la seconde mutation dans les patients atteints de polypose adénomateuse familiale (FAP) sont sélectionnés pour maintenir un niveau optimal de signalisation de la β -caténine. Cette sélection permet de conserver certaines répétitions de 20AAR, essentielles pour la régulation de la β -caténine, créant ainsi un environnement propice à la prolifération tumorale (figure 16) ⁴³.

L'étude approfondie des lignées cellulaires SW480 et HT29 permet de mieux comprendre les dynamiques spécifiques de la voie Wnt en relation avec les mutations du gène APC. Les différences observées dans l'activation de cette voie entre les deux lignées cellulaires illustrent l'importance des variations génétiques sur les mécanismes de signalisation intracellulaires. La sélection de ces deux lignées cellulaires pour notre étude repose sur leur représentation contrastée de l'activation de la voie Wnt ³⁸. Une autre différence est la présence de la mutation KRAS dans la lignée SW480. Cette mutation active de manière indirecte la voie de signalisation Wnt comme il a été vu à la figure 11.

I.8. But du Mémoire

Afin de mieux comprendre les effets spécifiques de l'augmentation de MG sur les voies de signalisation cellulaires, nous nous sommes basés sur une analyse de séquençage de l'ARN (RNA-seq) pour étudier les changements d'expression génique induits par l'inhibition de GLO1. Ces données préliminaires ont été obtenues par Fanny Lardinois, la doctorante en charge du projet, ont permis de révéler des modifications significatives de l'expression de plusieurs gènes.

Parmi les gènes étudiés de manière aléatoire, ceux impliqués dans la voie Wnt, tels que CTNNB1 (*Catenin Beta 1*, gène codant pour la β -caténine), GLIS2 (*Gli-similar 2*), LEF1 (*Lymphoid enhancer binding factor 1*), TCF4 (*Transcription factor 4*), ainsi que WNT6, WNT7B et WNT9A ont été particulièrement modulés en réponse à l'augmentation de MG (figure 17). Ces résultats suggèrent une influence du MG sur la voie de signalisation Wnt.

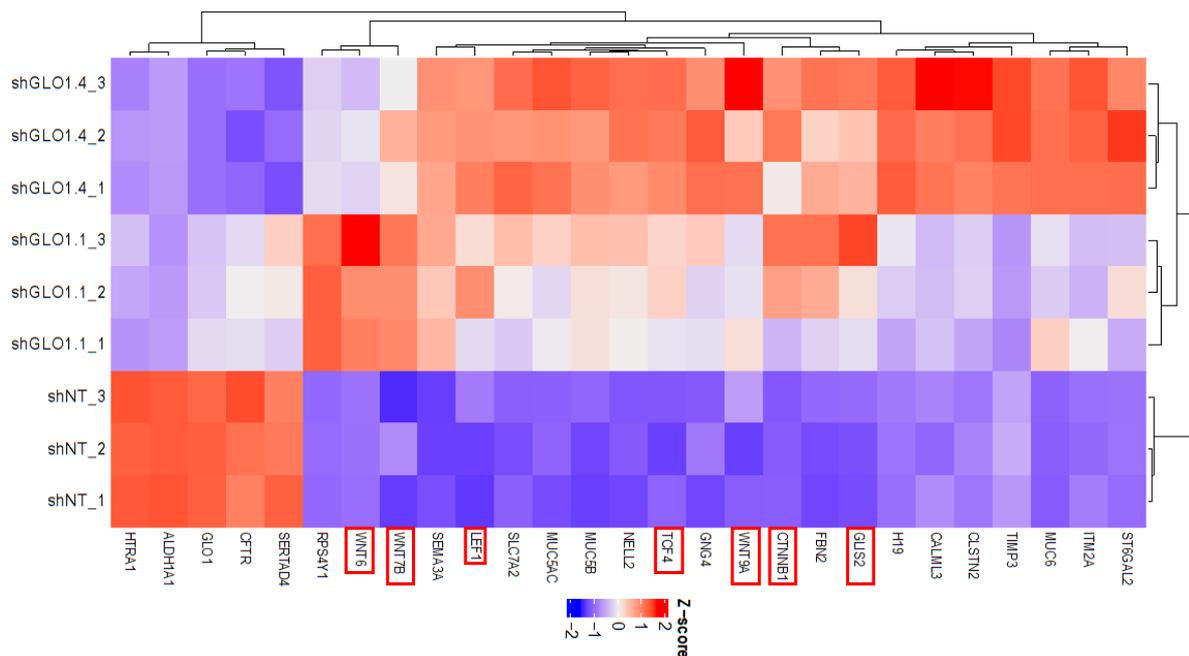


Figure 17: Effet de l'augmentation de méthylglyoxal (MG) sur l'expression des gènes de la voie de signalisation Wnt. Cette heatmap présente les changements d'expression génique induits par l'augmentation du méthylglyoxal (MG) dans des cellules traitées, avec un accent particulier sur les gènes impliqués dans la voie de signalisation Wnt. Les résultats montrent des variations significatives dans l'expression de plusieurs gènes, tels que **LEF1**, **TCF4**, **WNT6**, **WNT7B**, **GLIS2**, **CTNNB1** et **WNT9A**, qui apparaissent fortement modulés en réponse à l'élévation des niveaux de MG. Les couleurs varient du bleu (expression génique réduite) au rouge (expression génique augmentée), indiquant respectivement une régulation négative et positive.

L'hypothèse centrale de notre projet est que l'application de traitements exogènes de MG pourrait influencer la voie de signalisation Wnt, potentiellement en altérant l'expression et/ou

l'activité de certains effecteurs en aval de cette voie. Pour vérifier cette hypothèse, une série d'expériences a été réalisée afin de mesurer les niveaux de différents effecteurs de la voie Wnt après traitement de cellules de CRC avec du MG exogène.

II. Matériel et méthodes

II.1. Culture cellulaire

II.1.1. Lignées utilisées et leurs caractéristiques

Quatre lignées cellulaires issues de cancer colorectal humain ont été utilisées dans cette étude : HCT116, HT29, SW480 et SW620. Les informations les concernant sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1: informations générales sur les 4 lignées de CRC utilisées.

Nom	Lignée Cellulaire	Stade du Cancer
<i>HCT116</i>	Carcinome colorectal	Cancer colorectal de stade II
<i>HT29</i>	Adénocarcinome du côlon	Cancer colorectal de stade II
<i>SW480</i>	Adénocarcinome du côlon	Cancer colorectal de stade III
<i>SW620</i>	Métastase au niveau des ganglions lymphatiques	Cancer colorectal de stade IV

II.1.2. Manipulation des cellules

Les cellules sont adhérentes et ont été cultivées dans des flasques de 75 (Corning, réf. 431464U) dans un milieu de culture composé de RPMI1640 (Biowest, réf. L0501) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 2mM de L-glutamine (L-GLN).

Les cellules ont été maintenue en culture dans un incubateur humidifié, réglé à une température constante de 37°C et une concentration de CO₂ de 5%. Elles ont été utilisées pour un maximum de 10 passages. Lorsque la confluence atteignait environ 90%, les cellules ont été détachées à l'aide de solution de trypsine-EDTA à 0,25% (1%) pour être passées ou êtreensemencées pour une expérience, elles ont été comptées avec un compteur de cellules (CASY, Innovatis, Allemagne) pour être ensuiteensemencées à la densité voulue.

II.1.3. Traitements

Plusieurs drogues, aux concentrations et aux temps indiqués au niveau de la section Résultats, ont été utilisées pour réaliser les traitements sur cellules. Trois composés ont été utilisés : le méthylglyoxal (Sigma-Aldrich, réf. M0252), l'aminoguanidine (Sigma-Aldrich, réf. 3584) et la carnosine (Sigma-Aldrich, réf. C9625). Pour les différents traitements réalisés, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits (Corning Incorporated, réf. 3516, Costar) en mettant 500.000 cellules par puits.

II.2. Western blot

Le Western blot est une technique permettant de détecter et quantifier de manière relative des protéines spécifiques dans des échantillons. Cette méthode débute par la séparation des protéines selon leur masse moléculaire via une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), sous l'effet d'un champ électrique. L'utilisation d'un agent dénaturant, tel que le SDS (dodécyl sulfate de sodium) est une étape nécessaire afin d'avoir un rapport charge/masse uniforme, ce qui permet la bonne migration des extraits protéiques. Une fois séparées, les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) à l'aide d'un courant électrique, où les protéines d'intérêts sont ensuite détectées à l'aide d'anticorps primaires et secondaires associés. Ces anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase de raifort, qui génère un signal lumineux par une réaction de chimioluminescence, permettant ainsi la détection des protéines cibles sur des filtres X-Ray dans le cas du laboratoire.

II.2.1. Extraction des protéines

Un tampon de lyse a été préparé en ajoutant du SDS à 1% ainsi qu'un inhibiteur de phosphatases et de protéases. Les cellules ont été lysées dans le tampon de lyse à l'aide d'un cell-scrapper. Pour réduire la viscosité du lysat, l'ADN a été fragmenté par sonication pendant 5 secondes à une puissance de 2 watts. Les extraits protéiques obtenus ont ensuite été conservés à -20°C.

II.2.2. Dosage des protéines

Les protéines extraites ont été quantifiées en utilisant le kit BCA (bicinchoninic acid assay, réf. 23227, Thermo Scientific). Ce procédé se base sur la réduction des ions Cu(II) en Cu(I) par les liaisons peptidiques des protéines dans un environnement alcalin. Le Cu(I) ainsi

généralisé forme un complexe coloré en se liant à l'acide bicinchoninique. Pour réaliser l'analyse, 1 µL de lysat cellulaire réalisé précédemment est diluée dans une solution de SDS à 1 % pour obtenir un volume final de 25 µL. La concentration en protéines des échantillons est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage, établie avec des standards d'albumine de sérum bovin (BSA) préparés dans des conditions similaires. Le réactif BCA est constitué de deux solutions mélangées dans un rapport de 50:1, qui sont ensuite ajoutées aux échantillons suivie d'une incubation à 65°C pendant 30 minutes. L'absorbance est finalement mesurée à 562 nm avec un spectrophotomètre (FilterMax F5, Molecular Device), et les concentrations protéiques sont calculées en fonction de la courbe d'étalonnage.

II.2.3. Composition et préparation des gels

Nous avons utilisé la méthode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) pour l'électrophorèse des protéines. Pour ce faire, deux gels sont nécessaires : le gel de concentration et le gel de séparation. Le pourcentage de gel choisi pour le gel de séparation dépend de la taille de nos protéines d'intérêt. Pour séparer des molécules de petites tailles, un gel de séparation avec un pourcentage plus élevé est davantage approprié. Durant mon mémoire, des gels de séparation de 10% et 12,5% ont été utilisés. Ces gels sont constitués de l'acrylamide et d'une solution de TRIS-HCl, ajustée à un pH optimal pour garantir une séparation efficace des protéines, et contiennent du SDS pour assurer la dénaturation des protéines. Le gel de concentration est à 3,5% pour tous les Western-blots effectués. Le tétraméthyléthylènediamine (TEMED) et le persulfate d'ammonium (Sigma-Aldrich, réf. A3678) sont utilisés pour la polymérisation des gels.

II.2.4. Préparation des échantillons pour SDS-PAGE

Pour chaque échantillon, un total de 20 µg de protéines ont été dilués dans un mélange contenant du SDS 1% et de bleu de charge (60 mM de Tris-HCl pH 6.8, 25% de glycérol, 2% de SDS, 14.4 mM de 2-mercaptoéthanol, et 0.1% de bleu de bromophénol) afin d'atteindre un volume de 20 µl. Ce mélange est ensuite chauffé durant 5 min. à 99°C tout en les agitant à 350 rpm, afin d'assurer un mélange homogène et prévenir de toute agrégation des protéines. Un marqueur de poids moléculaire (Thermo Scientific, réf. 26616) est chargé sur un des puits du gel, en parallèle avec les échantillons, afin de permettre l'identification des bandes protéiques par comparaison avec les standards de poids moléculaire. Ce marqueur de poids moléculaire contient des protéines de poids connu qui, après migration, apparaissent sous forme de bandes

distinctes sur le gel SDS-PAGE. Ces bandes servent de référence pour estimer la taille des protéines d'intérêt dans les échantillons testés.

II.2.5. Migration protéique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse a été réalisée en faisant migrer les échantillons à 100 V jusqu'à atteindre le gel de séparation, puis à 120 V jusqu'à la fin de la cassette, dans un tampon d'électrophorèse composé de 25 mM de Tris, 192 mM de Glycine, et 0,1% de SDS.

II.2.6. Electrotransfert sur une membrane de fluor de polyvinylidène (PVDF)

Des membranes de PVDF ont été utilisées pour l'électrotransfert, réalisé à 100V pendant 1h30 à température ambiante. Le tampon de transfert, composé de 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 20% de méthanol, a été maintenu au froid pendant toute la durée du transfert.

II.2.7. Blocage des sites de liaison non spécifiques

Directement après le transfert, la membrane a été placée pendant 45 minutes dans un tampon Tris-Buffered-Saline-Tween (TBS-T - Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM ; pH 7.6, Tween-20 0.1%) contenant 5% de lait en poudre dégraissé (*Blotting grade blocker non-fat dry milk*, Biorad,).

II.2.8. Immunodétection

La membrane a été incubée avec l'anticorps primaire dilué dans TBS-T avec de la BSA 5% à 4°C toute la nuit sous agitation (voir tableau n°2 pour les détails des anticorps utilisés).

Tableau 2: Anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt.

Antigène cible	Origine	Type	Poids moléculaire	Dilution	Source	N° Cat.
AKR1B10	Souris	Monoclonal	~34 kDa	1/1000	Sigma-Aldrich	#SAB1405200
HSP27	Lapin	Monoclonal	~27 kDa	1/1000		#9709
Argpyrimidine	Souris	Monoclonal	/	1/1000	Koji Uchida (Japan)	
CD44	Souris	Monoclonal	~90 kDa	1/1000	Cell Signaling	#3570s

II. Matériel et méthodes

TCF1	Lapin	Polyclonal	~48 kDa	1/500	Cell Signaling	#2203
GLO1	Lapin	Polyclonal	~21 kDa	1/1000	Abcam	#NBP1-19015
C-Myc	Lapin	Polyclonal	~57 kDa	1/1000	Abcam	#5605
C-Met	Lapin	Polyclonal	~145 kDa	1/1000	Abcam	#8198
MG-Hs	Souris	Polyclonal	/	1/1000	Abcam	#243074
ALDH1A1	Lapin	Polyclonal	~55 kDa	1/1000	Cell Signaling	#6114
B-caténine Totale	Lapin	Polyclonal	~92 kDa	1/1000	Cell Signaling	#8480
B-caténine active	Lapin	Polyclonal	~92 kDa	1/1000	Cell Signaling	#5814
PFK2	Lapin	Polyclonal	~70 kDa	1/1000	Abcam	#2180
HK2	Lapin	Polyclonal	~102 kDa	1/1000	Abcam	#2106
GLUT1	Lapin	Polyclonal	~55 kDa	1/1000	Cell Signaling	#12939
DJ-1	Lapin	Polyclonal	~20 kDa	1/1000	Abcam	#5933
p-H2A.X (Ser139)	Lapin	Polyclonal	~15 kDa	1/1000	Cell Signaling	#2577

La membrane a été rincée trois fois avec du TBS-Tween (0,1%) pendant 5 minutes puis incubée avec de l'anticorps secondaire correspondant dilué (1/3000) dans TBS-T avec 5% de lait durant une heure. L'anticorps secondaire choisi dépend de l'espèce animal choisie pour l'anticorps primaire (voir tableau n°3). Après le temps d'incubation, la membrane a été rincée trois fois avec du TBS-Tween (0,1%) pendant 10 minutes.

Tableau 3: Anticorps secondaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt.

Antigène cible	Origine	Type	Dilution	Source	N° Cat.
Souris IgG	Lapin	Polyclonal	1/3000	DAKO	P0260
Lapin IgG	Souris	Polyclonal	1/3000	Cell Signaling Biotechnology	7074S

II.2.9. Révélation

La révélation de nos protéines d'intérêt s'est faite en utilisant le kit ECL (Thermo Fisher, ref 32106). La réaction catalysée par la HRP conjuguée à l'anticorps secondaire a oxydé le luminol, générant une émission lumineuse détectée par un film d'autoradiographie (Fuji Medical X-ray, Fujifilm). Si la révélation à l'aide du kit ECL ne donnait pas de résultats satisfaisants, le Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, réf. 170-5060) a été utilisé comme alternative. Ce substrat offre une sensibilité très élevée, jusqu'au niveau du femtogramme, permettant ainsi de détecter des quantités extrêmement faibles de protéines. Le signal produit par le CLARITY reste stable pendant environ 24 heures, offrant la possibilité d'une exposition prolongée sur les films d'autoradiographie.

II.2.10. Normalisation

Pour éviter d'éventuelles erreurs ou imprécisions dans le chargement des protéines sur le gel d'électrophorèse, une protéine de référence, dont les niveaux restent stables dans nos conditions expérimentales, est utilisée comme contrôle. La β -actine a été utilisée comme protéine de référence (Tableau 4). Les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps primaire de la β -actine dilué dans une solution TBS-T avec du lait 5% durant 30 minutes à température ambiante. Après l'incubation avec l'anticorps primaire, la membrane est lavée trois fois 5 minutes sous agitation à l'aide du TBS-T. Ensuite, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire également dilué dans une solution de blocage TBS-T avec du lait 5% pendant 30 minutes à température ambiante. Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane subit une nouvelle série de trois lavages de 10 minutes chacun avec du TBS-T Lait 5% pour éliminer l'excès d'anticorps secondaire non lié. La révélation se fait de la même façon que pour les protéines d'intérêt à l'aide du kit ECL.

Tableau 4: Anticorps primaire et secondaire utilisés pour la détection de la β -Actine.

Antigène cible	Origine	Type	Poids moléculaire	Dilution	Source	N° Cat.
β -Actine	Souris	Monoclonal	~42 kDa	1/3000	Uniprot	P60709
Souris IgG	Lapin	Polyclonal	/	1/3000	DAKO	P0260

La quantification des western blots a été effectuée à l'aide du logiciel Fiji (Image J).

II.3. Immunofluorescence pour la détection des antigènes cibles

Les cellules étaientensemencées sur des lamelles en verres placées dans une plaque de 24 puits à une confluence de 50 à 70 %. Dans le cadre de l'immunofluorescence pour la

détection des antigènes cibles, deux protocoles distincts ont été employés, chacun présentant des étapes spécifiques adaptées à des besoins expérimentaux particuliers.

Dans le protocole initial, les lamelles ont été stérilisées en les plaçant sur du papier Tork et en les exposant à de l'alcool suivi d'une irradiation UV pendant environ 10 minutes. Les lamelles ont ensuite été placées dans une plaque de 24 puits où les cellules ont étéensemencées pour atteindre une confluence de 50 à 70 %. Après une incubation de 6 heures avec le traitement, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du PBS pendant 15 à 20 minutes à température ambiante, puis perméabilisées avec une solution de Triton X-100 à 0,2 % dans du PBS. Le blocage a été effectué en utilisant du BSA à 3 % dans du PBS sans glycine, pendant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires (Tableau 5) ont été dilués au 1/200 dans du PBS (BSA à 3 %) et incubés toute la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires (Tableau 6), dilués au 1/500 dans le même tampon de blocage, ont été incubés conjointement avec le colorant Hoechst (Calbiochem, réf. 382061) pendant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité.

Un protocole adapté a été mis en place pour optimiser la spécificité des résultats. Dans cette version, le paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS a été utilisé pour la fixation des cellules pendant 20 minutes à température ambiante. La perméabilisation a été réalisée avec du Triton X-100 à 0,1 % dans du PBS pendant 10 minutes. Un tampon de blocage modifié, comprenant du Tween-20 à 0,1 %, du BSA à 1 %, et 22 mg/mL de glycine dans du PBS, a remplacé l'ancien tampon, permettant une réduction plus efficace des interactions non spécifiques. Les anticorps primaires (Tableau 5) ont été dilués au 1/200 dans ce nouveau tampon de blocage sans glycine et incubés toute la nuit à 4°C. Une incubation séparée avec les anticorps secondaires (Tableau 6) dilués au 1/100 a été effectuée pendant 2 heures à température ambiante dans l'obscurité, suivie d'une incubation distincte avec le colorant Hoechst.

Tableau 5: Anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt.

Antigène cible	Origine	Type	Poids moléculaire	Dilution	Source	N° Cat.
B-caténine Totale	Lapin	Polyclonal	~92 kDa	1/1000	Cell Signaling	#8480
B-caténine active	Lapin	Polyclonal	~92 kDa	1/1000	Cell Signaling	#5814

Tableau 6: Anticorps secondaires utilisés pour la détection des protéines d'intérêt.

Antigène cible	Origine	Type	Dilution	Source	N° Cat.
IgG (de lapin)	Âne	Polyclonal	1/100	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	A-21206

Ensuite, les lamelles ont été lavées et incubées avec le colorant Hoechst dilué dans du PBS selon les recommandations du fabricant, généralement à une concentration finale de 1 µg/mL. Cette incubation avec Hoechst a duré 45 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

Après l'incubation avec le Hoechst, les lamelles ont été lavées trois fois avec 500 µL de PBS pour éliminer l'excès de colorant. Les lamelles ont ensuite été montées sur des lames de microscope avec du Fluoromount-G™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, réf. 00-4958-02) et stockées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'observation. L'observation des lames a été réalisée à un grossissement de 40x à l'aide d'un microscope confocal inversé Leica Stellaris 8.

II.4. Concentration inhibitrice à 50%

L'IC50, ou concentration inhibitrice à 50%, représente la concentration du composé nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50% par rapport à un contrôle non traité. Cette mesure est utilisée pour évaluer la cytotoxicité des composés sur les cultures cellulaires et est cruciale pour déterminer la concentration à laquelle un composé commence à être efficace sans être excessivement nocif.

Les cellules HT29 ont étéensemencées à 80 000 cellules par ml par puits dans une plaque de 24 puits, puis incubées pendant 16 heures pour permettre leur adhérence avant le début des traitements. Les cellules ont été traitées à des concentrations croissantes des composés testés, réparties en triplicats. Trois composés ont été étudiés : le méthylglyoxal (MG), l'aminoguanidine et la carnosine. Huit concentrations, y compris un contrôle ont été préparées selon une série de dilutions. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures. Le milieu de culture a été aspiré, et les puits ont été rincés trois fois avec 1 ml de PBS par puits. Les puits contenant 1 ml de PBS ont ensuite été soumis à une sonication à 50 % d'intensité pendant 10 secondes afin de lyser les cellules. Après sonication, 100 µl de chaque puits ont été transférés dans une plaque 96 puits pour la lecture. Un colorant Hoechst, qui se lie spécifiquement à l'ADN en s'insérant dans les sillons mineurs, a été dilué au 1:100 dans du PBS. Ce colorant fluorescent permet de quantifier le nombre de cellules par puits en mesurant l'intensité de la fluorescence,

laquelle est proportionnelle à la quantité d'ADN, et donc au nombre de cellules présentes. Chaque puits a reçu 100 μ l de cette solution, puis les plaques ont été incubées à l'obscurité à température ambiante pendant 10 minutes. La lecture des plaques a été effectuée avec un lecteur de plaque configuré pour détecter la fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 360 nm et une longueur d'onde d'émission de 465 nm, avec un temps d'intégration de 400 ms.

II.5. Immunoprécipitation des protéines d'intérêt

Nous avons ensemencé les différentes lignées cellulaires dans des flasques de 75 mm de manière à atteindre une confluence de 80 à 90 % le lendemain. Le milieu de culture cellulaire a été retiré, puis nous avons lavé les cellules avec 10 mL de PBS. Ensuite, 300 μ L de tampon de lyse non dénaturant ont été ajoutés à chaque flasque de culture. La composition du tampon non dénaturant est la suivante : Tris-HCl pH 8 (20 mM), NaCl (137 mM), NP-40 (1%), EDTA (2 mM), inhibiteur de protéase, inhibiteur de phosphatase et de l'eau milliQ. Après lyse des cellules, le lysat a été passé dix fois à travers un homogénéisateur Dounce « tight ».

Ensuite, nous avons incubé les lysats pendant 30 minutes à 4°C sous agitation. Après incubation, nous les avons centrifugés à 14 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C et collecté le surnageant. Nous avons procédé à une quantification des protéines par méthode BCA pour déterminer la concentration protéique. Nous avons pris le volume nécessaire de billes magnétiques (Thermo Scientific, réf. 88803), soit 30 μ L par condition plus 10%. Les billes ont été lavées une fois avec le tampon non dénaturant pendant 5 minutes sous agitation à température ambiante. Un aimant a été utilisé pour retirer le tampon de lavage, et les billes ont été rincées avec une solution de BSA à 10 mg/mL. Ensuite, nous avons ajouté 400 μ L de tampon non dénaturant à la solution contenant les billes et la BSA et avons incubé le tout à 4°C toute la nuit sous rotation. Pour chaque échantillon, 500 μ g de lysat protéique ont été utilisés. Nous avons ajouté 5 μ g d'anticorps spécifique ou 5 μ g d'anticorps de contrôle IgG à chaque échantillon. Les échantillons ont été incubés à 4°C toute la nuit sous rotation.

Le lendemain, nous avons utilisé un aimant pour retirer la solution de BSA des billes, puis avons lavé les billes une fois avec le tampon non dénaturant pendant 5 minutes sous agitation à température ambiante. Les billes ont été resuspendues dans le tampon non dénaturant, et 30 μ L de la solution de billes préparée ont été aliquotés dans chaque tube d'échantillon contenant le mélange protéines et anticorps. Une incubation de 2 heures à 4°C sous rotation a suivi. Nous avons utilisé un aimant pour collecter les billes et retiré le

surnageant. Les échantillons ont été lavés deux fois avec un tampon à faible concentration en sel et une fois avec un tampon à haute concentration en sel, chaque lavage durant 5 minutes sous agitation à température ambiante. Une solution de bromophénol bleu 2X a été préparée en diluant du bromophénol bleu 5X dans du SDS à 1%. Nous avons ajouté 40 μ L de bromophénol bleu 2X à chaque échantillon. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 10 minutes avec agitation, puis mélangés par vortex, centrifugés brièvement, et un aimant a été utilisé pour isoler les billes. Nous avons collecté le surnageant contenant les protéines immunoprécipitées. Pour la suite, nous avons suivi le protocole de Western blot.

Nous avons utilisé des anticorps spécifiques pour l'immunoprécipitation des protéines d'intérêt (voir Tableau 7).

Tableau 7: Anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation.

Protéine cible	Origine de l'anticorps	Type d'anticorps	Quantité utilisée (μg)	Source	N° Cat.
Argpyrimidine	Souris	Monoclonal	5	Koji Uchida (Japan)	N213430
IgG de souris	Souris	Monoclonal	5	Invitrogen	02-6502

Pour le Western Blot, nous avons utilisé des anticorps primaires et secondaires (Tableaux 2 et 3) pour détecter les protéines immunoprécipitées.

III. Résultats

III.1. Niveau de bases dans différentes lignées cellulaires

Comme expliqué dans la section Introduction, notre choix de lignées cellulaires de CRC pour explorer les effets potentiels du stress du MG exogène sur la voie Wnt s'est naturellement porté sur les cellules des lignées HT29 et SW480 présentant, respectivement, une activité Wnt modérée et élevée³⁸. Nous avons évalué l'expression de l'hexokinase (HK2), et du transporteur de glucose GLUT1, deux acteurs clé de la glycolyse et de 3 enzymes majeures de détoxification du MG (GLO1, AKR1B10 et DJ1) dans les lignées HT29 et SW480 ainsi que dans les lignées HCT116, et SW620 dont les caractéristiques sont résumées au Tableau 1 (Section Matériel et Méthodes). Il est intéressant de noter que les cellules SW480 expriment de plus faibles niveaux des enzymes de détoxification du MG (GLO1, AKR1B10 et DJ1) par rapport aux cellules HT29 (Figure 18). En revanche, elles présentent le plus haut niveau de base, parmi les lignées analysées, du transporteur du glucose GLUT1 (Figure 18).

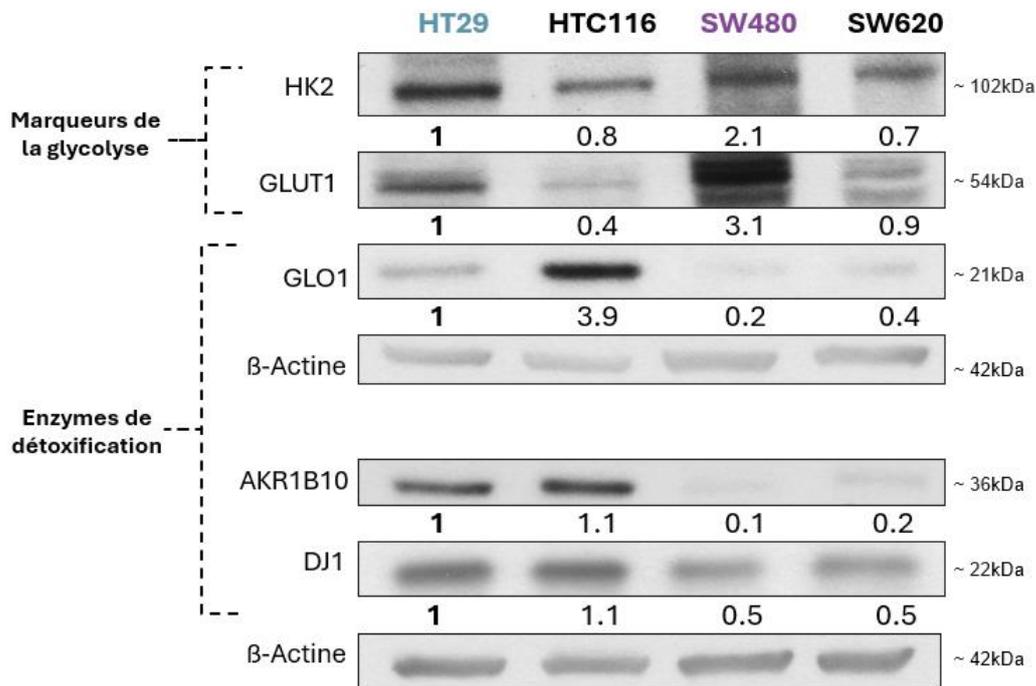


Figure 18: Analyse par Western blot de l'enzyme HK2, GLUT1 et d'enzymes de détoxification du MG dans des lignées cellulaires du CRC. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β -actine.

III.2. Caractérisation de la sensibilité des lignées de CRC au méthylglyoxal

III.2.1. Calcul des concentrations inhibitrices 50 (IC50) sur les lignées HT29 et SW480

Il est important de déterminer la sensibilité des lignées au MG avant d'entreprendre des traitements exogènes. Cette évaluation était nécessaire pour ajuster les concentrations de MG à utiliser afin d'éviter la cytotoxicité excessive tout en maximisant les effets biologiques pertinents. En particulier, la concentration de MG nécessaire pour atteindre une inhibition de 50% de la viabilité cellulaire (IC50) permet d'utiliser une concentration n'excédant pas la moitié de l'IC50 pour le traitement des cellules. L'analyse des IC50 a montré que la lignée cellulaire SW480 possède une IC50 de 602 μM pour le MG après 24 heures de traitement (figure 19B), ce qui est plus élevé que celle de la lignée HT29 qui est de 481 μM (figure 19A). Cette observation suggère une tolérance plus prononcée des cellules SW480 au MG comparativement au HT29. La résistance observée au niveau des cellules SW480 est surprenante étant donné son profil d'expression, qui montre une expression réduite des enzymes de détoxification et une expression élevée des marqueurs de la voie glycolytique (Figure 19). Cela suggère l'existence de mécanismes compensatoires qui permettent à SW480 de mieux tolérer le MG.

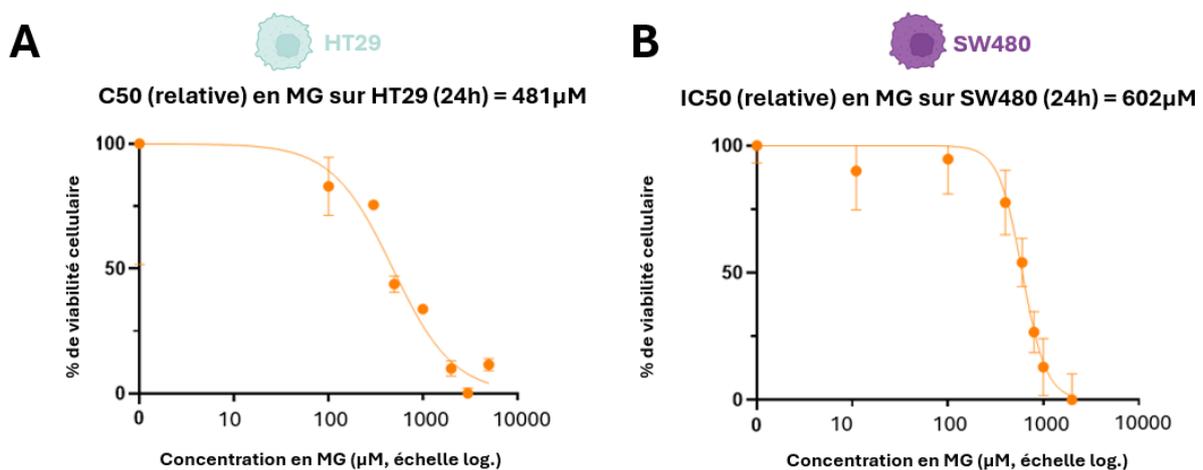


Figure 19: Courbes de dose-réponse pour la détermination des concentrations inhibitrices 50 (IC50) de MG. (A) Courbe réalisée sur la lignée cellulaire HT29 après 24 heures de traitement. **(B)** Courbe réalisée sur la lignée cellulaire HT29 après 24 heures de traitement. Les pourcentages de viabilité cellulaire sont présentés en fonction des concentrations croissantes de MG (en μM , échelle logarithmique). Les points représentent la moyenne \pm écart type de trois expériences techniques.

III.2.2. Détection des adduits du MG après apport exogène de MG

À la suite de l'identification des IC50 de MG, nous avons sélectionné une gamme de concentrations de 0, 50, 100 et 200 μM pour les cellules HT29 et SW480. Nous avons détecté les adduits du MG (MG-Hs) formés en présence de MG, afin de vérifier si le traitement au MG exogène entraîne une glycation des protéines. Pour affiner notre choix du temps de traitement optimal, nous avons investigué deux temps de traitements différents : 6 et 24 heures, sur les deux lignées cellulaires (figure 20A). Nous pouvons voir qu'il y a une induction des adduits lors des traitements avec une concentration de 200 μM de MG durant 6h sur les 2 lignées cellulaires. Cependant cette induction n'est pas observée à la concentration de 100 μM de MG et est perdue au temps de 24h à la concentration de 200 μM (figure 20A). Un second Western Blot a été réalisé en utilisant davantage de protéines de la lignée HT29 après 6h de traitements afin de déterminer si des concentrations plus faibles pouvaient induire des adduits (figure 20B). Il s'avère que nous pouvons observer une induction des MG-Hs sous les trois concentrations testées de MG (50, 100 et 200 μM) (figure 20B).

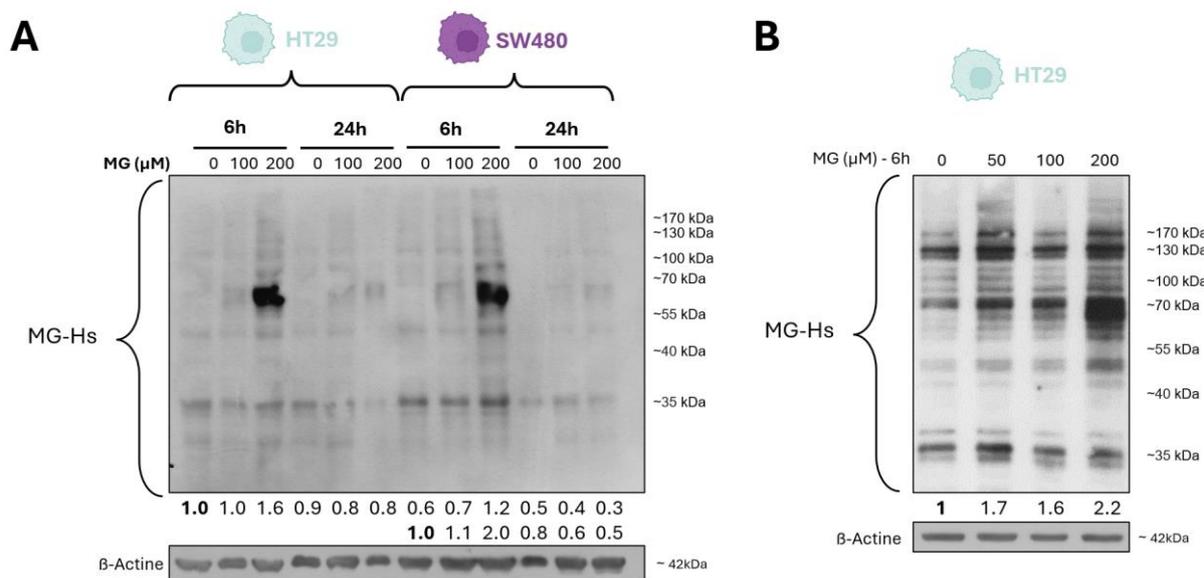


Figure 20: Détection des adduits du MG au niveau des cellules de CRC. Les cellules HT29 et SW480 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. **(A)** Western Blot des cellules HT29 et SW480 après 6h et 24h de traitement. **(B)** Western Blot des cellules HT29 après 6h de traitement. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β -actine.

III.3. Expression des enzymes de détoxification principales du MG post-traitement au MG exogène

Après avoir analysé les adduits formés par le MG, nous allons examiner les mécanismes de défense cellulaire par rapport à ce stress tel que révélé par l'expression des enzymes de détoxification.

III.3.1. GLO1

GLO1 est une enzyme clef qui détoxifie le MG en le convertissant en D-lactate.

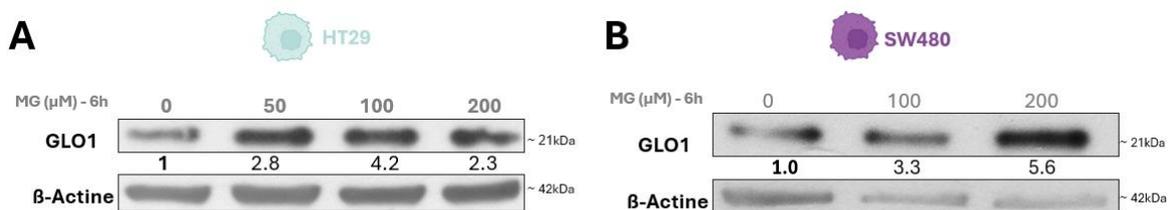


Figure 21: Détection de l'enzyme de détoxification GLO1 au niveau des cellules de CRC. (A) Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. **(B)** Les cellules SW480 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la B-actine.

Les résultats des Western Blots pour GLO1 sur la lignée HT29 (Figure 21A) montrent une augmentation de l'expression de cette enzyme en réponse à des concentrations croissantes de MG durant 6 heures. Une forte induction du niveau basal de GLO1 a également été observée pour la lignée SW480 (Figure 21B). Cette observation est cohérente avec des études antérieures menées au Laboratoire, où une induction de GLO1 sous l'effet du MG a été rapportée, notamment dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et U87-MG, reconnues pour leur profil glycolytique⁴⁴. Ces résultats indiquent que les cellules HT29 et SW480, tout comme les lignées glycolytiques précédemment étudiées, adoptent un mécanisme compensatoire en augmentant l'expression de GLO1 pour gérer le stress induit par le MG, confirmant ainsi la validité de notre traitement et l'activation de cette voie de détoxification spécifique⁴⁴.

III.3.2. AKR1B10

Après avoir examiné l'expression et la régulation de GLO1, il est important de considérer une autre enzyme importante pour contrer le stress de glycation : l'aldokétoréductase AKR1B10. Bien que son rôle soit moins central que celui de GLO1 dans la

détoxification du MG, AKR1B10 peut aussi contribuer à cette dernière. Il a déjà été observé dans la littérature que AKR1B10 est surexprimé quand GLO1 est inhibée dans la lignée U87-MG, ce qui pourrait suggérer un rôle compensatoire ⁴⁴. Les résultats montrent une modulation à la hausse de l'expression de l'enzyme AKR1B10 en réponse à l'augmentation des concentrations de traitements de MG dans la lignée cellulaire HT29 (figure 22A). En revanche, dans la lignée SW480, les résultats confirment un niveau non détectable d'expression de AKR1B10 (figure 22B). Un niveau très faible avait déjà été observé en Figure 18 lors de la comparaison des niveaux de base des lignées de CRC confirmant que cette enzyme n'est pas ou très peu exprimée dans ces cellules, ce qui avait déjà été observé dans des études antérieures ⁴⁵. Bien que très peu présente de base dans les cellules SW480, il était intéressant de voir si le MG pourrait induire son expression mais cela n'a pas été le cas.

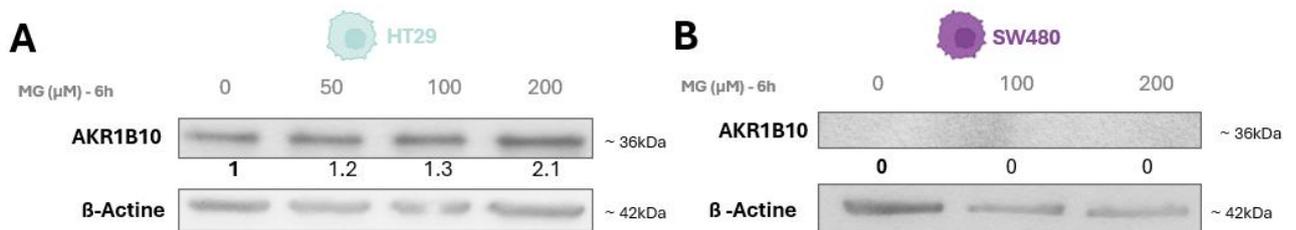


Figure 22: Détection d'AKR1B10 au niveau des cellules de CRC. (A) Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. **(B)** Les cellules SW480 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β-actine.

III.3.3. ALDH1A1

Pour compléter notre étude des enzymes de détoxification impliquées dans la réponse au MG, nous avons examiné l'expression de ALDH1A1. Les cellules HT29 ont montré une induction de l'expression de cette enzyme sous traitement MG exogène (figure 23).

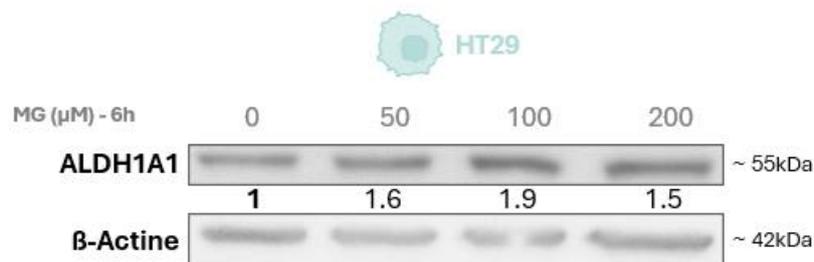


Figure 23: Détection pour ALDH1A1 au niveau des HT29. Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des

bandes réalisées à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β -actine.

L'induction des enzymes de détoxification sous traitement MG dans la lignée HT29 montre que ces cellules réagissent à ce stress métabolique en activant plusieurs mécanismes de défense. Dans la lignée SW480, les résultats obtenus suggèrent une adaptation cellulaire au traitement principalement basée sur GLO1, tout en notant que nous n'avons pas pu y analyser le niveau d'ALDH1A1 par manque de temps.

III.4. Exploration de la voie de signalisation Wnt

Après avoir établi les conditions et les conséquences de stress du MG dans les deux lignées de CRC d'intérêt, nous avons entrepris d'en explorer les effets sur la voie de signalisation Wnt.

III.4.1. Détection de la β -caténine par Immunofluorescence au niveau des cellules de CRC

Pour débiter cette partie du projet, nous nous sommes concentrés sur la détection et la localisation de la β -caténine, l'un des principaux effecteurs de la voie canonique Wnt. Nous avons réalisé de l'immunofluorescence (IF) avec le protocole utilisé en routine au Laboratoire afin de visualiser l'expression et la distribution subcellulaire de la β -caténine totale en présence de MG au niveau des cellules HT29 (figure 24A) et SW480 (figure 24B) en comparaison à des cellules non traitées.

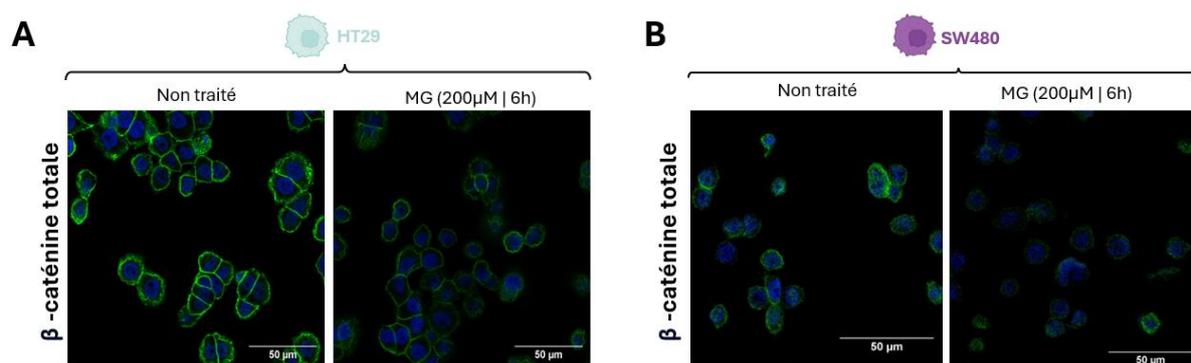


Figure 24: Immunofluorescence de la β -caténine totale au niveau des cellules de CRC. (A) Les images d'immunofluorescence dans la lignée cellulaire HT29 montrent la distribution de la β -caténine totale en condition non traitée et après traitement avec 200 μ M de MG pendant 6 heures. (B) Les images d'immunofluorescence dans la lignée cellulaire SW480 montrent la distribution de la β -caténine totale en condition non traitée et après traitement avec 200 μ M de MG pendant 6 heures. Le marquage de la β -caténine totale est visible en vert, et les noyaux cellulaires sont colorés par Hoechst en bleu.

La β -caténine totale est principalement détectée à la membrane comme attendu de par son interaction avec la E-cadhérine, le composant central des jonctions adhérentes entre cellules³⁶. Nous n’observons pas de marquage cytoplasmique ou nucléaire dans aucune des deux lignées ce qui nous laisse penser que la forme active de la β -caténine (non phosphorylée) est moins efficacement détectée par cet anticorps. Après traitement au MG, une diminution de l’intensité de la fluorescence de la β -caténine totale est observée dans la lignée HT29 ([figure 24A](#)) et dans la lignée SW480 ([figure 24B](#)). Après avoir observé la diminution de la β -caténine totale en présence de MG, nous avons voulu voir si cette diminution pouvait être en faveur de l’expression de la β -caténine transcriptionnellement active (non phosphorylée) en utilisant un anticorps spécifiquement dirigé contre celle-ci.

Par ailleurs, nous avons consulté une étude qui rapporte une translocation de la β -caténine active vers le noyau en réponse à un traitement par CHIR99021, un inhibiteur de GSK3, qui permet d’induire efficacement la voie Wnt⁴⁶. Dans cette même étude, les cellules HT29 ont été traitées avec CHIR99021 (4 μ M) pendant 5 heures, et la β -caténine a montré une accumulation significative tant membranaire que nucléaire ([figure 25](#)). Ces auteurs mentionnent l’utilisation d’un protocole d’IF différent de celui utilisé habituellement dans notre laboratoire, Nous avons donc adapté notre protocole dans le but d’améliorer nos observations de la β -caténine. Les principales adaptations incluent : (a) l’augmentation du temps de fixation, (b) une perméabilisation moins stringente à l’aide de triton et (c) l’introduction de Tween-20 et de glycine dans le tampon de blocage. Ces modifications visent notamment à améliorer la préservation des structures cellulaires et à réduire le bruit de fond.

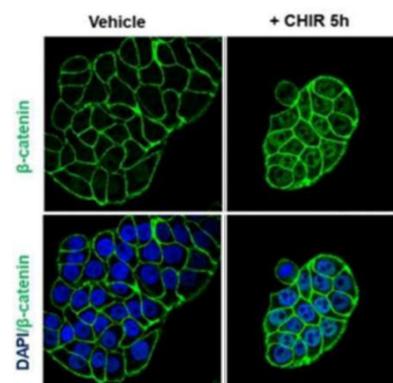


Figure 25: Images de microscopie confocale la β -caténine nucléaire dans des cellules HT29. Les cellules ont été traitées soit avec un contrôle, soit avec 4 μ M de CHIR pendant 5 heures. Le marquage de la β -caténine est visible en vert, et les noyaux cellulaires sont colorés par DAPI en bleu. Source⁴⁷.

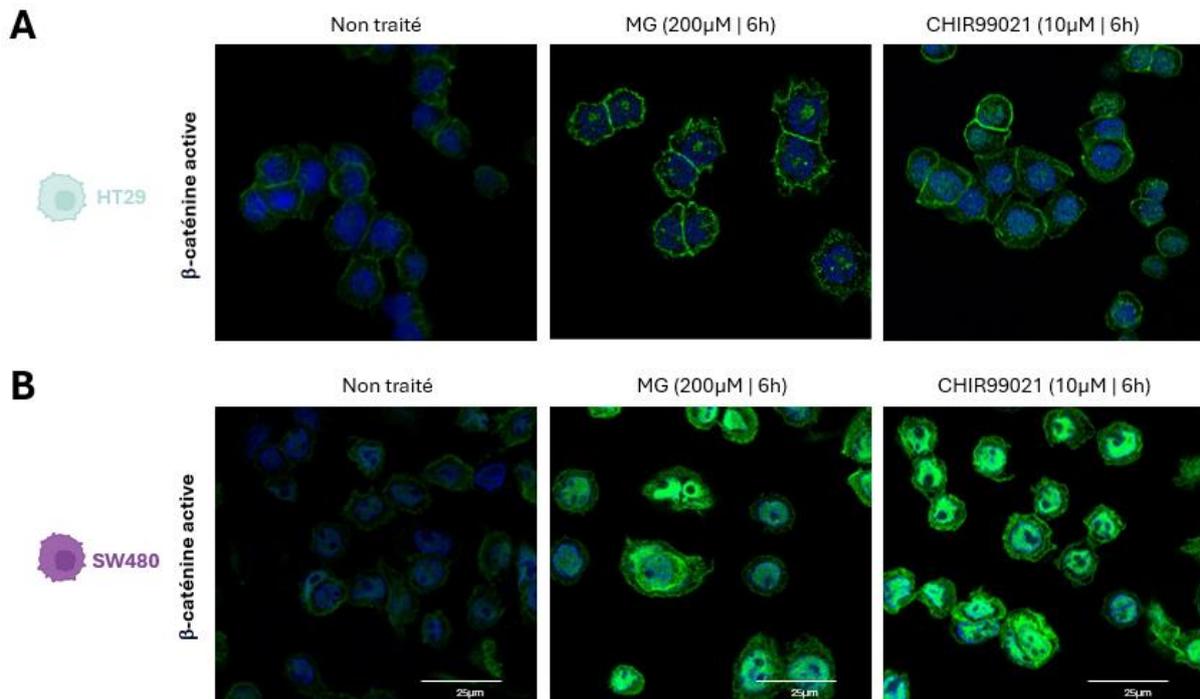


Figure 26: Immunofluorescence de la β -caténine active au niveau des cellules de CRC. (A) Les images d'immunofluorescence dans la lignée cellulaire HT29 montrent la distribution de la β -caténine active en condition non traitée et après traitement avec 200 μ M de MG pendant 6 heures. (B) Les images d'immunofluorescence dans la lignée cellulaire SW480 montrent la distribution de la β -caténine active en condition non traitée et après traitement avec 200 μ M de MG pendant 6 heures. Le marquage de la β -caténine totale est visible en vert, et les noyaux cellulaires sont colorés par Hoechst en bleu.

Après modification du protocole, la β -caténine totale a été à nouveau visualisée dans les deux lignées cellulaires avec la condition CHIR99021 comme contrôle positif. Nous avons observé un marquage amélioré de la β -caténine tant au niveau de la membrane qu'en intracellulaire. Par soucis de clarté, ces résultats ne sont pas montrés. En utilisant le protocole modifié avec CHIR99021 comme contrôle positif, nous avons réévalué la β -caténine active. Globalement le marquage de la β -caténine est apparu localisé à la membrane pour les cellules HT29 (figure 26A) et plus en intracellulaire pour les cellules SW480 (figure 26B). Le marquage observé avec le traitement CHIR99021 montre bien une augmentation de la β -caténine active en intracellulaire pour les deux lignées. De manière intéressante, le traitement MG induit une surexpression de la β -caténine qui apparaît tant au niveau membranaire que nucléaire (voire nucléolaire, bien que non encore rapporté dans la littérature à notre connaissance) dans les cellules HT29. Pour les cellules SW480, cet effet majeur du MG est remarquable du fait qu'il est similaire au marquage induit par le CHIR99021 utilisé comme contrôle positif. Dans les cellules de CRC d'intérêt, cette expérience indique que le traitement au MG provoque une

augmentation de la β -caténine active, comparable à celle observée avec le traitement au CHIR99021.

III.4.2. Détection de la β -caténine par Western blot au niveau des cellules de CRC en présence de MG

En complément à nos observations préliminaires en immunofluorescence, nous avons décidé d'évaluer l'expression de la β -caténine totale et active par Western blot. Bien que la formation des adduits de MG soit plus marquée à 6 heures, les effets en aval sur la signalisation cellulaire et la régulation du niveau des protéines d'intérêt pourraient nécessiter plus de temps pour se manifester pleinement. C'est pourquoi nous avons envisagé deux durées de traitement au MG : 6 et 24 heures. De manière générale, l'exposition au MG a montré une tendance à induire une augmentation de l'expression de la β -caténine active dans les cellules HT29 après 6 heures de traitement (figure 27). Cependant, cette induction semble transitoire, car elle n'est pas maintenue à 24 heures. En revanche, le traitement avec CHIR99021 a entraîné une augmentation de l'expression de la β -caténine active, observable aussi bien à 6 heures qu'à 24 heures (figure 27). Concernant la β -caténine totale, une augmentation a été observée à la fois après 6 heures et 24 heures de traitement au MG (figure 27). Enfin, l'analyse du rapport entre la β -caténine active et totale révèle que l'exposition au CHIR99021 entraîne une augmentation de ce ratio, ce qui n'est pas constaté sous traitement MG dont l'effet est potentiellement moins marqué dans ces conditions de traitement.

Bien que le rapport β -caténine active et totale n'augmente pas significativement, nous observons une induction de l'expression à 6 heures de la β -caténine active et totale, ce qui pourrait indiquer une induction de la voie Wnt. Pour une analyse plus précise de la localisation de la β -caténine active, un fractionnement cytoplasmique et nucléaire pourrait être envisagé. Ce fractionnement permettrait de distinguer la β -caténine présente dans le noyau, où elle est active et exerce son rôle transcriptionnel, de celle qui reste dans le cytoplasme. Une telle approche pourrait fournir des informations plus précises quant à la dynamique de la β -caténine en réponse au traitement par le MG, en particulier sur sa localisation nucléaire, qui est un indicateur de l'activation de la voie Wnt.

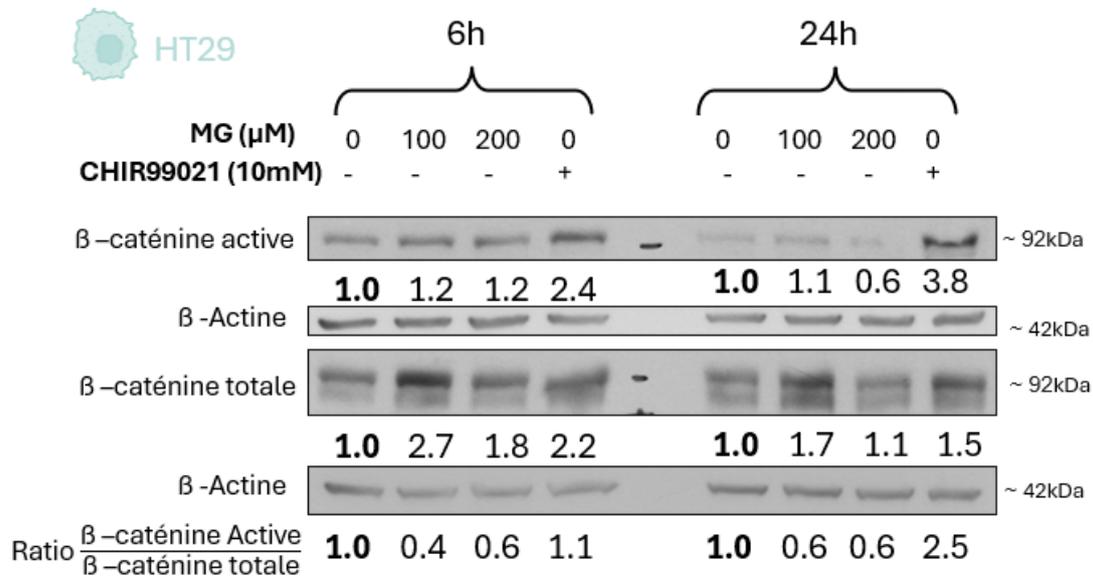


Figure 27 : Détection de la β -caténine active et totale au niveau des cellules de CRC. Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués et de CHIR99021, un inhibiteur de GSK3. Le ratio β -caténine active sur totale est montré. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β -actine.

III.4.3. Détection des gènes cibles de la voie Wnt

Après avoir examiné l'impact du MG sur la β -caténine par immunofluorescence et Western blot, nous avons étendu notre étude aux effets du MG sur des gènes cibles de la voie Wnt. Nous avons utilisé le Western blot pour mesurer les niveaux de protéines de trois gènes importants régulés par la voie de signalisation Wnt : c-Myc, CD44 et TCF1.

III.4.3.1. c-Myc

Le premier gène cible que nous avons examiné est c-Myc, un facteur de transcription qui favorise la croissance cellulaire et la division.

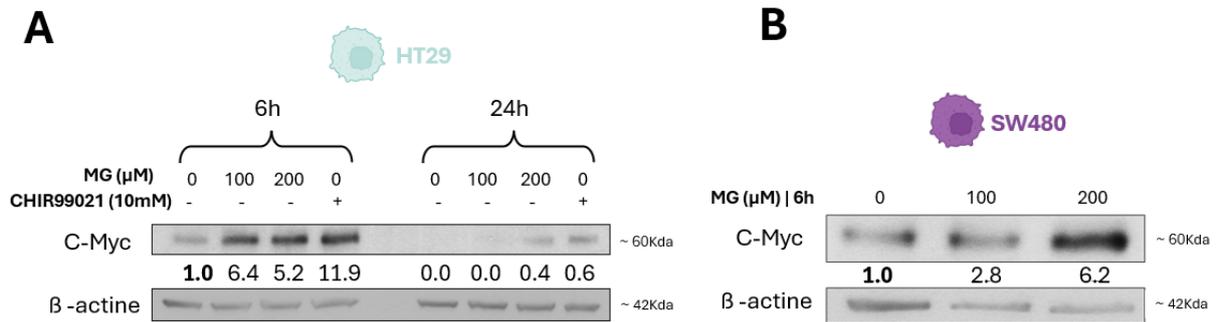


Figure 28: Détection de c-Myc au niveau des cellules de CRC. (A) Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués et de CHIR99021, un inhibiteur de GSK3. **(B)** Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β-actine.

Après 6 heures de traitement, une augmentation très significative de l'expression de c-Myc est observée sous l'effet du MG. Comme attendu sous l'action de CHIR99021, qui est un agoniste de la voie Wnt à travers l'augmentation de la β-caténine, nous avons observé une forte induction de c-Myc (figure 28A). Toutefois, après 24 heures, l'expression de c-Myc apparaît réduite de base, tout en restant détectable en présence de 200 μM de MG et de CHIR99021 (figure 28A). En ce qui concerne la lignée cellulaire SW480, l'analyse à 6 heures révèle également une augmentation de l'expression de c-Myc en réponse au traitement au MG (figure 28B). L'augmentation significative de c-Myc en présence de MG indiquerait une activation potentielle de la voie Wnt.

III.4.3.2. CD44

Comme pour c-Myc, nous constatons une augmentation dose dépendante de l'expression de CD44, un autre gène cible de la voie Wnt activée, dans les lignées HT29 (figure 29A) et SW480 en présence de MG (figure 29B). Cette induction de CD44 vient renforcer l'hypothèse d'une activation de la voie Wnt en présence de MG.

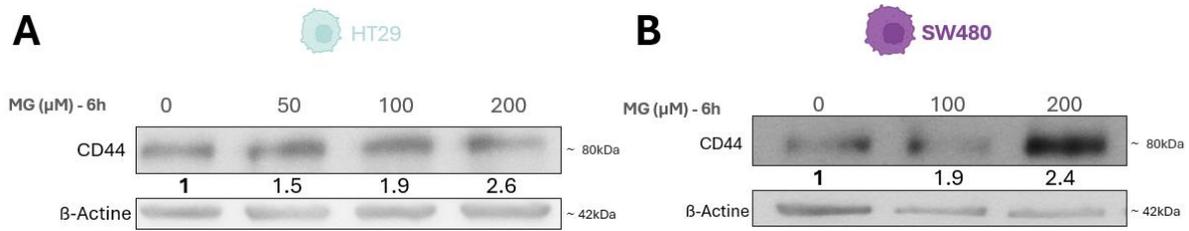


Figure 29: Détection de CD44 au niveau des cellules de CRC. (A) Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. **(B)** Les cellules SW480 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β-actine.

III.4.3.3. TCF1

Finalement, nous nous sommes concentrés sur TCF1, un facteur de transcription directement impliqué dans la transcription des gènes cibles de la voie Wnt.

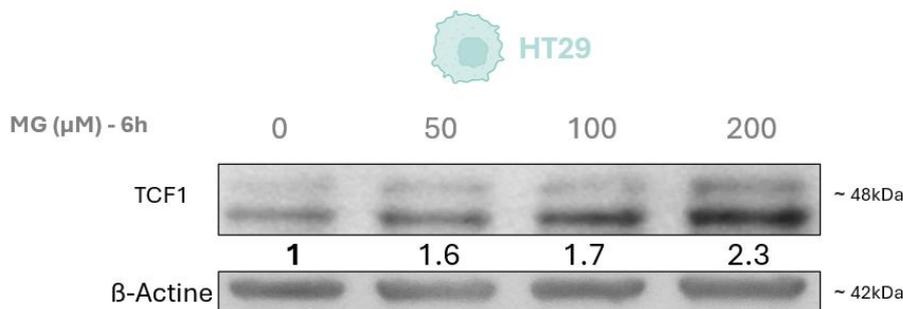


Figure 30: Détection de TCF1 au niveau des HT29. Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β-actine.

Les résultats des Western blots pour l'expression de TCF1 dans les cellules HT29 traitées avec différentes concentrations de MG pendant 6 heures révèlent une augmentation dose-dépendante de TCF1 (figure 30).

L'induction observée des gènes c-Myc, CD44, et TCF1 indique une activation de la voie Wnt en réponse au traitement avec le MG des cellules de CRC.

III.5. Capacité des agents neutralisants du MG à inverser les effets du traitement MG exogène

Après avoir examiné les effets du MG sur l'expression de plusieurs acteurs de la voie Wnt, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation de la capacité des agents neutralisants du MG à inverser les effets de ce dernier.

III.5.1. Carnosine

La carnosine, un dipeptide formé de bêta-alanine et d'histidine, est connue pour ses propriétés antioxydantes. Elle a été étudiée pour son potentiel à neutraliser les composés réactifs comme le MG et à protéger les cellules des effets cytotoxiques de ce dernier⁴⁸.

III.5.1.1. Concentration inhibitrice à 50%

Comme pour les traitements sous MG, il est intéressant de déterminer la sensibilité des lignées à la carnosine avant de mettre les cellules en présence de ce traitement et ne pas en masquer les effets biologiques. Ces valeurs indiquent la concentration de carnosine nécessaire pour atteindre une inhibition de 50% de la viabilité cellulaire. Les résultats montrent que l'IC50 relative de la carnosine sur HT29 après 24 heures de traitement est de 207 mM (figure 31A). Elle est de 117mM sur la lignée SW480 (figure31B). Bien que moins sensibles au MG, les cellules SW480 résistent moins au traitement à la carnosine.

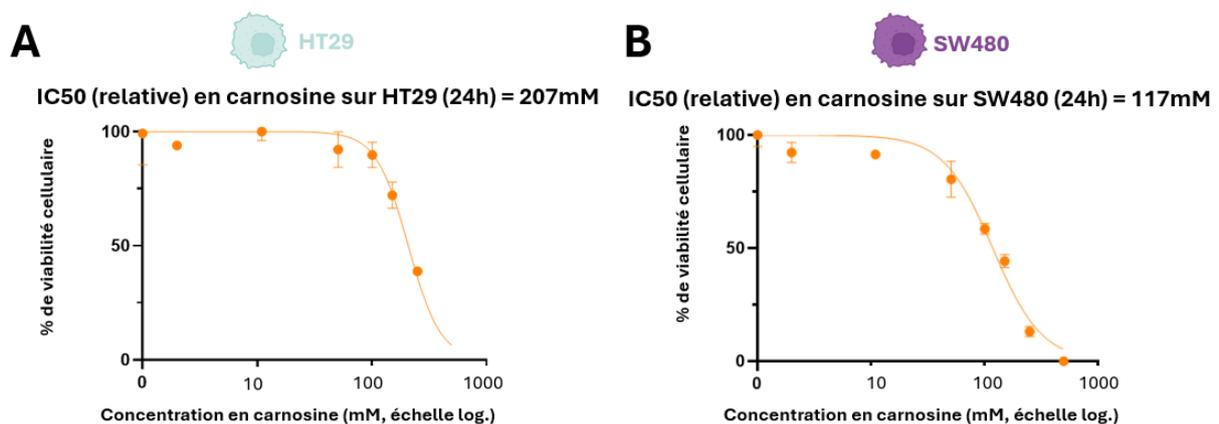


Figure 31: Courbes de dose-réponse pour la détermination des concentrations inhibitrices 50 (IC50) de carnosine. (A) Courbe réalisée sur la lignée cellulaire HT29 après 24 heures de traitement. (B) Courbe réalisée sur la lignée cellulaire HT29 après 24 heures de traitement. Les pourcentages de viabilité cellulaire sont présentés en fonction des concentrations croissantes de carnosine (en mM, échelle logarithmique). Les points représentent la moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes.

III.5.1.2. Réversion des inductions observées sous MG

Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de MG, ainsi qu'avec de la carnosine seule (70 mM) et en combinaison avec chaque concentration de MG. L'objectif était de déterminer si la carnosine pouvait atténuer les effets induits par le MG sur l'expression des protéines AKR1B10, GLO1, CD44, et TCF1.

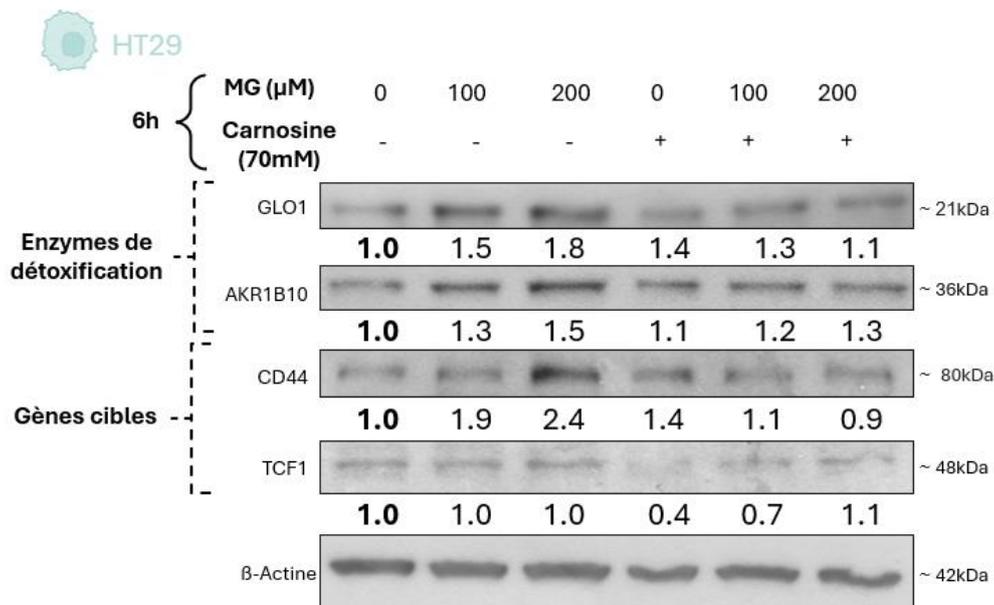


Figure 32 : Analyse par Western blot des protéines GLO1, AKR1B10, CD44 et TCF1 au niveau des cellules de CRC. Les cellules HT29 ont été traitées avec différentes concentrations de MG et avec ou sans Carnosine, un agent neutralisant du MG (70mM), pendant 6 heures. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la B-actine.

Comme attendu, le MG induit l'expression des protéines AKR1B10, GLO1, et CD44. Alors que l'expression de TCF1 n'a pas montré l'induction significative observée précédemment (Figure 30). La carnosine seule a entraîné une légère augmentation de l'expression d'AKR1B10 et une augmentation plus marquée de GLO1 et CD44. L'addition de la carnosine aux traitements MG semble atténuer l'augmentation observée lorsque le MG est utilisé seul pour AKR1B10, CD44, et GLO1 (figure 32).

Nous avons effectué les mêmes traitements pour la lignée cellulaire SW480 afin de déterminer si la carnosine peut également y atténuer les effets du MG (figure 33).

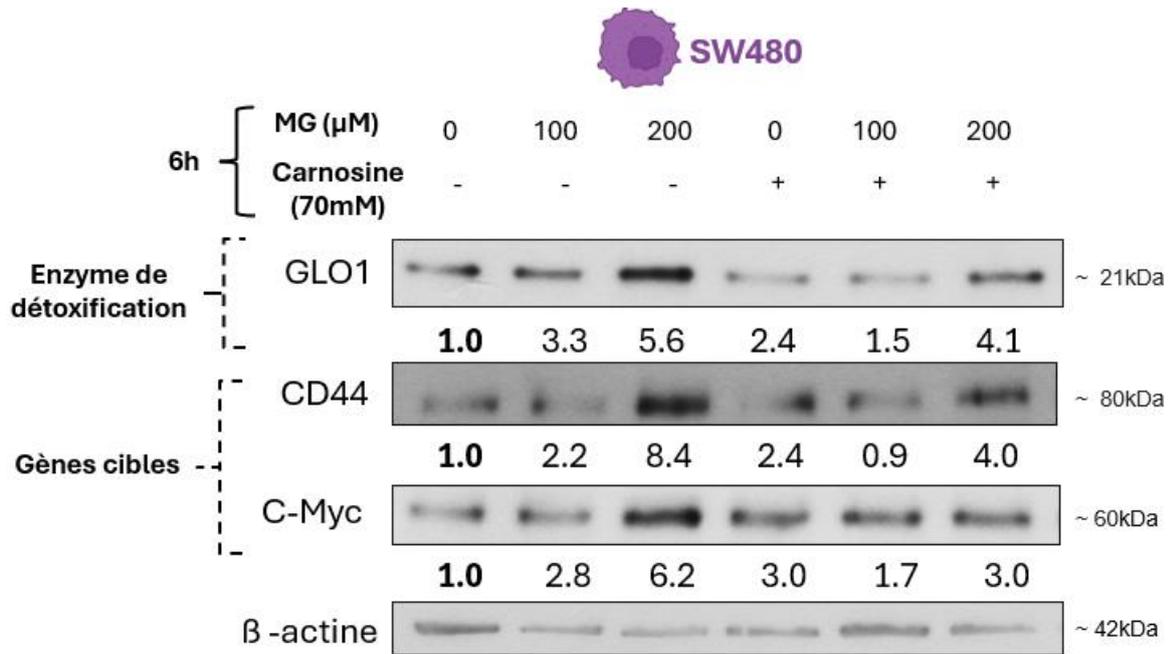


Figure 33: Détection des protéines GLO1, CD44 et c-Myc au niveau des cellules de CRC. Les cellules SW480 ont été traitées avec différentes concentrations de MG et avec ou sans Carnosine, un agent neutralisant du MG (70mM), pendant 6 heures. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β-actine.

Nous avons bien observé une induction significative des protéines GLO1, c-Myc, et CD44 sous traitement MG. La carnosine seule induit également ces protéines, mais à un niveau beaucoup moins élevé que sous traitement MG. Mais ce qui est important à constater c'est que la combinaison entre le MG et la carnosine parvient à inverser partiellement l'induction marquée observée sous traitement MG seul lorsqu'il est utilisé à 100μM, réduisant l'expression des protéines GLO1, c-Myc, et CD44 (figure 33). Lorsque le MG est utilisé à 200μM, nous constatons que la dose de carnosine de 70mM est moins efficace à inverser son effet.

III.5.2. Aminoguanidine

Nous allons maintenant aborder l'utilisation de l'aminoguanidine, un autre agent neutralisant du MG.

III.5.2.1. Concentration inhibitrice à 50%

Comme pour le MG et la carnosine, il est intéressant de déterminer la concentration inhibitrice à 50% de l'aminoguanidine. Les résultats montrent que l'IC50 relative de l'aminoguanidine sur la lignée HT29 après 24 heures de traitement est de 4,6 mM (figure 34A) et est de 10,6 mM sur la lignée SW480 (figure 34B). Les cellules SW480 apparaissent moins

sensibles que les cellules HT29 à cet agent neutralisant, ce qui est l'inverse de la carnosine où elles étaient plus sensibles que les cellules HT29.

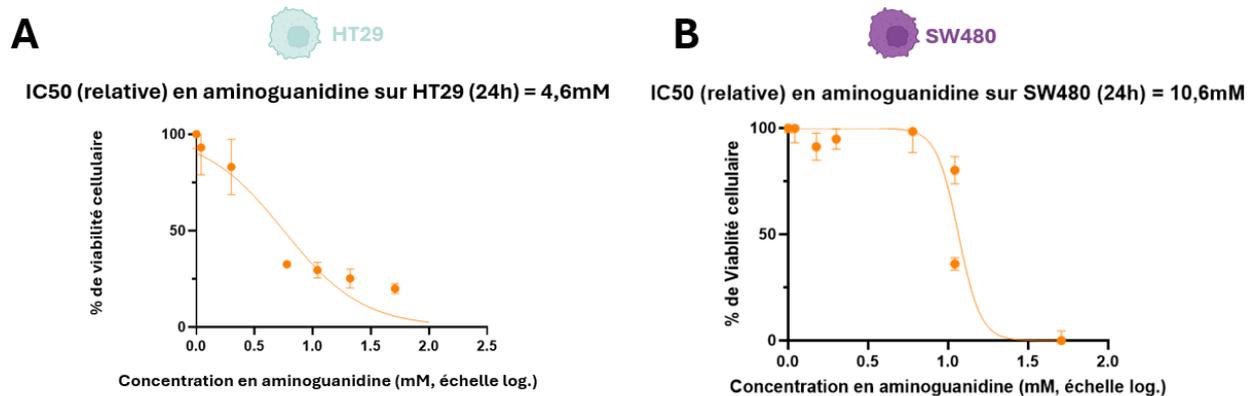


Figure 34: Courbes de dose-réponse pour la détermination des concentrations inhibitrices 50 (IC50) d'aminoguanidine. (A) Courbe réalisée sur la lignée cellulaire HT29 après 24 heures de traitement. **(B)** Courbe réalisée sur la lignée cellulaire SW480 après 24 heures de traitement. Les pourcentages de viabilité cellulaire sont présentés en fonction des concentrations croissantes d'aminoguanidine (en mM, échelle logarithmique). Les points représentent la moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes.

III.5.2.2. Réversion des inductions observées sous MG

L'objectif était de déterminer si l'aminoguanidine pouvait atténuer les effets d'induction des traitements de MG, comme déjà constaté avec la carnosine, sur l'expression des protéines AKR1B10, GLO1, TCF1, et C-Met.

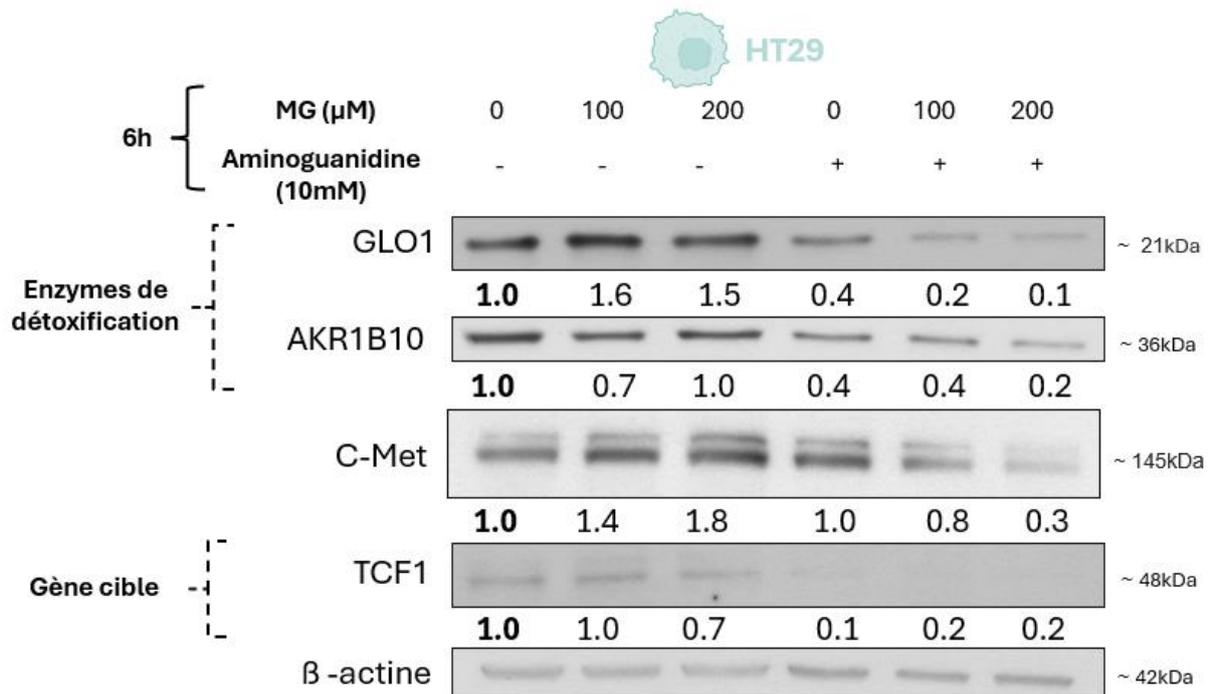


Figure 35: Détection des protéines GLO1, AKR1B10, C-Met et TCF1 au niveau des cellules de CRC. Les cellules HT29 ont été traitées avec différentes concentrations de MG et avec ou sans Aminoguanidine (10mM), un agent neutralisant du MG, pendant 6 heures. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β-actine.

Les protéines GLO1 et C-Met ont bien été induites par les traitements au MG dans la lignée cellulaire HT29. La combinaison de l'aminoguanidine avec le MG a réussi à inverser cette induction indiquant que cet effet est bien attribuable à l'addition de MG exogène (figure 35). En revanche, bien que l'induction de TCF1 et AKR1B10 ait été constatée dans les mêmes conditions lors d'analyses antérieures (figures 30 et 22A, respectivement), elle n'a pas été observée dans ce cas-ci. Par conséquent, en l'absence d'induction, il est difficile de tirer des conclusions quant à l'effet de l'ajout d'aminoguanidine aux cellules HT29 traitées au MG. Les cellules SW480 n'ont pas été analysées dans ces mêmes conditions par manque de temps.

III.6. Mécanismes de l'induction de la β -caténine au niveau des cellules de CRC

III.6.1. Induction de C-met : un inhibiteur de GSK3

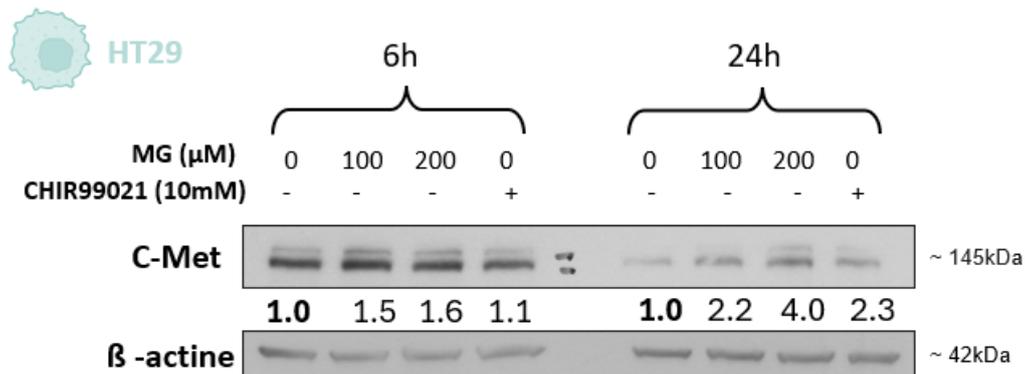


Figure 36 : Détection de C-Met au niveau des cellules de CRC. Les cellules HT29 ont été traitées aux concentrations de MG et aux temps indiqués et de CHIR99021, un inhibiteur de GSK3. Les chiffres représentent la quantification de l'intensité des bandes réalisée à l'aide d'ImageJ par rapport à la référence. Le chiffre en gras représente la condition de référence arbitrairement fixée à 1. Toutes les bandes ont été normalisées par rapport à la β -actine.

Les résultats montrent qu'à 6 heures, il y a une augmentation de l'expression de C-Met sous traitement MG (figure 36). À 24 heures, bien que l'expression de C-Met de base diminue par rapport à la condition 6 heures, elle reste plus élevée dans les cas de traitement MG et CHIR99021 comparée aux cellules non traitées. Cette induction de C-Met pourrait contribuer, au moins en partie, à l'augmentation de la β -caténine active observée en présence de MG. Aucun effet n'est attendu sur l'expression de C-Met avec le traitement CHIR99021, étant tous les deux des inhibiteurs de GSK3.

III.6.2. Augmentation de la β -caténine par glycation au niveau des cellules de CRC ?

Des études ont montré que la glycation par le glyoxal (GO), un dicarbone de structure proche de celle du MG, inhibe l'activité de la protéine Wnt3a, un membre de la famille des protéines Wnt, et réduit sa capacité à activer les gènes cibles via le complexe β -caténine/TCF-4. Cette inhibition est illustrée par une diminution de la liaison de la β -caténine à TCF-4, suggérant une perturbation de la transduction du signal Wnt⁴⁹. Dans le contexte de ce projet, nous explorons les mécanismes potentiels de l'activation de la voie Wnt par le MG. Ici, nous

proposons l'hypothèse selon laquelle le MG stabiliserait la β -caténine par glycation. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les adduits argpyrimidines du MG pour l'immunoprécipitation suivie de la détection par Western blot de protéines cibles potentielles (β -caténine) ou connues (HSP27) du MG a été réalisée pour les deux lignées CRC d'intérêt. Cela permet d'investiguer si des mécanismes de modification post-traductionnels similaires à ceux rapportés pour le GO pourraient également être pertinents pour le MG.

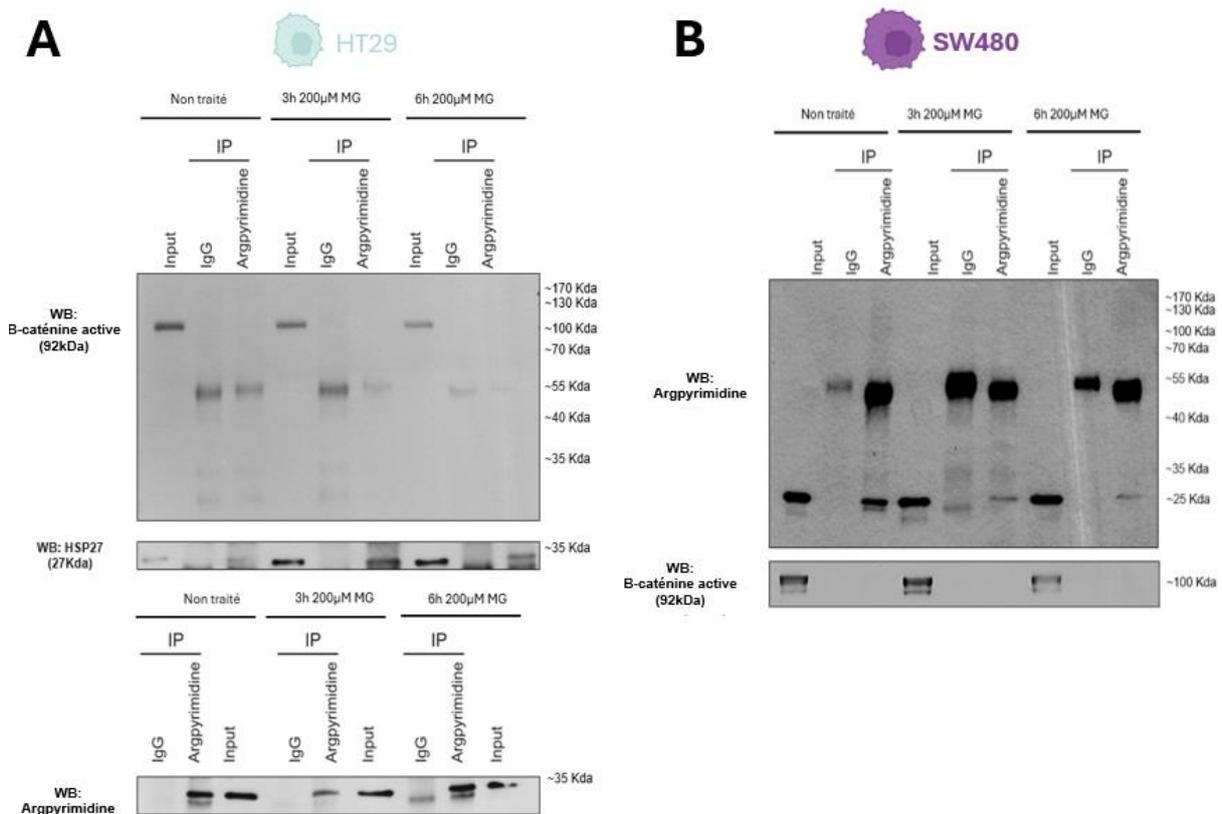


Figure 37: Immunoprécipitation suivie de Western blot dans les lignées cellulaires HT29 et SW480, non traitées et traitées avec 200 μ M de MG pendant 3 heures et 6 heures. (A) Dans les cellules HT29, l'immunoprécipitation a été réalisée à l'aide d'anticorps anti-argpyrimidine, suivie d'une analyse par WB pour la détection de la β -caténine active, de HSP27, et des adduits argpyrimidinse. (B) Dans les cellules SW480, l'immunoprécipitation a également été réalisée avec des anticorps anti-argpyrimidine, suivie d'une analyse par WB pour la détection des adduits argpyrimidines et de la β -caténine active.

L'étape d'immunoprécipitation permet d'enrichir l'extrait protéique total en adduits de type argpyrimidines. Trois conditions ont été testées : un groupe non traité, et deux groupes traités avec 200 μ M de MG pendant 3 heures et 6 heures. Pour les lignées cellulaires HT29 (Figure 37A) et SW480 (Figure 37B), des Western blots ont été effectués sur le produit de l'IP pour détecter la β -caténine active (figures 37A et 37B), HSP27 (Figure 37A), et les adduits argpyrimidines (figures 37A et 37B). Concernant l'IP réalisée sur les cellules HT29, HSP27 a

été utilisé comme contrôle positif car des études antérieures ont montré que cette protéine chaperonne pouvait être modifiée par le MG dans des lignées cellulaires issues de différents types de cancers ²⁵. Concernant la β -caténine active, bien que sa présence ait été confirmée dans les échantillons initiaux (input), aucune détection n'a été possible après immunoprécipitation avec les anticorps anti-argpyrimidines. Cela suggère que la β -caténine active n'est pas modifiée par glycation, ou du moins, pas à un niveau détectable dans ces conditions expérimentales testées.

IV. Discussion

Dans le cadre de ce travail, nous avons exploré les effets potentiels du MG sur les intermédiaires de la voie Wnt en utilisant des modèles pré-cliniques de CRC humain. Pour ce faire, nous avons sélectionné deux lignées d'intérêt, HT29 et SW480, sur base de leurs caractéristiques en termes d'activation de la voie Wnt et de leur degré de différenciation³⁸. Les cellules SW480 présentant une activité Wnt de base plus marquée et un degré de différenciation moindre que les cellules HT29. Aussi, notre évaluation sommaire de la voie de la glycolyse a montré des niveaux d'hexokinase 2 et de GLUT1 plus élevés dans les cellules SW480 que dans les HT29 suggérant que les premières seraient plus glycolytiques. Il serait intéressant de compléter cette observation par une évaluation du métabolisme énergétique (taux de consommation en oxygène et taux d'acidification du milieu extracellulaire) de ces deux lignées en temps réel en utilisant la technologie Seahorse (Agilent).

En première intention, nous avons entrepris d'évaluer la réponse de ces lignées, lorsqu'elles sont mises en présence de MG, en termes de capacité d'expression de diverses enzymes de détoxification du MG et d'adduits protéiques (de type argpyrimidines et MG-Hs) formés. Les cellules cancéreuses des deux lignées ont montré une réponse similaire au MG lorsqu'il s'agit de l'expression de GLO1, la majeure enzyme de détoxification du MG connue à ce jour. En revanche, ces deux lignées se sont montrées différentes quant à l'expression de l'aldo-kétoréductase AKR1B10 puisque cette enzyme n'était pas détectable par western blot au niveau des cellules SW480 alors qu'elle voit son expression augmentée dans les cellules HT29 en réponse au MG. L'expression différentielle d'AKR1B10 pourrait être intéressante à explorer plus en avant du fait que cette enzyme est considérée comme un gène suppresseur de tumeurs dont la perte est favorable à la prolifération et à la migration des cellules de CRC⁵⁰. L'enzyme AKR1B10 n'est pas exprimée dans les cellules SW480 suggérant que ce gène suppresseur de tumeur est perdu dans ces cellules indifférenciées par rapport aux cellules HT29 qui l'expriment toujours. Il serait intéressant par exemple d'exprimer AKR1B10 au niveau des cellules SW480 et d'en évaluer d'une part l'impact sur le stress du MG et d'autre part sur le phénotype agressif de ces cellules, avec un focus particulier sur l'état d'activation de la voie Wnt. Enfin, l'ALDH1A1, connue pour détoxifier le MG en pyruvate, n'a pas montré d'altération significative de son niveau d'expression dans les cellules HT29 en présence de MG. L'ALDH1A1 n'a pu être évaluée dans les cellules SW480 par manque de temps.

Quant aux adduits protéiques du MG, leur accumulation était significativement augmentée de manière dose dépendante à des concentrations de MG équivalentes à la moitié de la dose inhibitrice 50 (IC50) préalablement calculée pour chaque lignée cellulaire. Alors que ces adduits étaient détectables après 6h de traitement au MG, leur accumulation était beaucoup moins évidente après 24h suggérant que le MG et/ou les adduits possèdent une demi-vie relativement courte. Aussi les adduits protéiques formés pourraient voir leur dégradation, notamment via le protéasome, accélérée. Enfin, cette diminution des adduits au fil du temps pourrait être le reflet de la neutralisation efficace du MG par les enzymes de détoxification dont nous avons observé l'induction en présence de MG dans ces cellules.

En deuxième intention, nous avons exploré l'expression de la β -caténine au niveau des lignées cancéreuses étudiées. L'utilisation de la technique d'IF, bien que très intéressante à mettre en pratique pour sa facilité et pour l'information visuelle qu'elle apporte, ne s'est pas avérée toujours simple à interpréter surtout lorsqu'il s'agissait d'apprécier la sub-localisation cellulaire de la β -caténine. En utilisant un anticorps dirigé contre la β -caténine totale, la fluorescence était essentiellement observée au niveau de la membrane cellulaire pour les cellules HT29 et au niveau du cytoplasme et du noyau pour les cellules SW480. Ce qui serait compatible avec une activité Wnt plus marquée dans les cellules SW480 par rapport aux cellules HT29. Après adaptation du protocole d'IF et l'ajout d'un contrôle positif de l'activation de la β -caténine (l'agoniste Wnt CHIR99021), notre analyse a permis de considérer que le traitement au MG renforce la localisation nucléaire de la β -caténine puisque sa détection montre une intensité similaire à celle du contrôle positif utilisé. Lorsque nous avons voulu utiliser ces mêmes anticorps dirigés contre la β -caténine totale et active en Western blot, nous avons bien observé une tendance à l'augmentation de la β -caténine active sous traitement MG, toutefois moins importante que celle induite en présence de CHIR99021.

Encouragés par cette tendance, nous avons continué l'exploration de l'activation de la voie Wnt par le MG à travers l'expression de ses principaux gènes cibles, à savoir C-Myc et CD44. En présence de MG, ces gènes ont montré une induction dose dépendante et significative de leur expression au niveau des deux lignées CRC d'intérêt. Ainsi, le stress du MG pourrait contribuer à induire l'activation basale de la voie canonique Wnt au niveau des cellules cancéreuses du colon et favoriser leur prolifération. La preuve de l'induction de ces gènes en présence de MG, à travers l'augmentation de β -caténine active, pourra être obtenue en utilisant des inhibiteurs du complexe transcriptionnel β -caténine-TCF décrits pour avoir un effet anti-

tumeur dans le CRC ⁵¹. C-Myc est un oncogène crucial impliqué dans le contrôle de processus majeurs tels que la prolifération, l'échappement à l'apoptose et la chimiorésistance de nombreux types de tumeurs. De plus, C-Myc joue un rôle clé dans la régulation de la glycolyse aérobie (effet Warburg) en activant directement la transcription d'enzymes de la voie glycolytique et du transporteur de glucose GLUT1 ⁵². Notre observation de l'induction significative de l'expression de C-Myc en présence de MG au niveau des cellules de CRC laisse penser qu'un cercle vicieux pourrait s'établir : (a) partant de la glycolyse aérobie favorisée par C-Myc, (b) ayant pour conséquence la production de MG, et qui est (c) suivie en retour de l'induction de C-Myc par le MG.

L'augmentation de la β -caténine au niveau protéique en présence de MG n'a jamais encore été rapportée à notre connaissance et méritera toute l'attention de notre équipe dans la continuité de ce projet. Pour tenter d'en explorer les mécanismes moléculaires, nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle la β -caténine serait une cible directe du MG et subirait une glycation post-traductionnelle qui favoriserait sa stabilité face à l'action du complexe destructeur qui tend à la maintenir phosphorylée et dégradée par le protéasome. Nos tentatives d'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre les adduits du MG n'ont cependant pas permis de confirmer cette hypothèse. Une immunoprécipitation inverse pourrait être tentée en utilisant des anticorps anti- β -caténine. Enfin, il serait intéressant de conduire des expériences de RT-PCR afin de vérifier si la β -caténine est augmentée au niveau mRNA, auquel cas le mécanisme pourrait être autre que la glycation directe de la protéine.

Sur base de nos résultats préliminaires, une autre piste à considérer dans la continuité de ce travail sera sans nul doute la possibilité de l'induction de C-Met par le MG puisqu'il active une voie parallèle à la voie Wnt qui aboutit à l'inhibition de GSK3 β et donc à l'augmentation du niveau cellulaire de β -caténine active.

Dans la suite de ce travail, nous avons utilisé des inhibiteurs de MG bien établis tels que la carnosine et l'aminoguanidine pour tenter de bloquer l'effet pro-cancer du MG médié par la voie Wnt canonique. Ces deux inhibiteurs se sont avérés efficaces pour contrer l'induction des gènes cibles de la voie Wnt dans les cellules CRC d'intérêt. Ces résultats sont prometteurs et permettent de proposer l'hypothèse selon laquelle le blocage du stress de glycation pourrait représenter une nouvelle voie thérapeutique dans le CRC sachant que la majorité de ces tumeurs sont mutées pour le gène APC et sont principalement conduites par une activation de la β -caténine ⁵³. A ce stade de nos conclusions, il est intéressant de noter que la curcumine, le

pigment majeur extrait du rhizome du curcuma, connu comme étant un puissant inhibiteur de MG⁵⁴ a été décrite comme thérapie anti-cancéreuse dans le CRC⁵⁵. A l'instar de la carnosine qui est produite par notre organisme, cette molécule naturelle pourrait donc avoir des effets bénéfiques pour les patients cancéreux sans pour autant présenter de toxicité majeure.

Entre autres avantages, ce projet a eu pour intérêt de nous plonger dans une lecture détaillée des mécanismes de l'activation de la voie Wnt et en particulier a révélé à nos yeux la complexité des mutations affectant le gène suppresseur de tumeurs APC (voir Introduction). Dans la continuité de ce travail, le choix des lignées de CRC d'intérêt devra probablement être affiné et élargi : en particulier selon les mutations APC considérées, et de manière plus générale sur base du background mutationnel des lignées humaines de CRC disponibles. Ainsi, il est remarquable que la lignée SW480 présente une mutation KRAS capable d'induire la signalisation de la voie PI3K/AKT (*cross-talk*). Les travaux antérieurs menés au Laboratoire ont montré que les cellules de CRC mutées KRAS, et de ce fait résistantes à la thérapie ciblée anti-EGFR, sont rendues sensibles à cette thérapie grâce, au moins en partie, à l'inactivation d'AKT qui est observée en présence de carnosine²⁵. Il est intéressant de penser que la carnosine conduirait à l'inhibition de la β -caténine active à travers la neutralisation du MG et l'inhibition d'AKT dans le contexte des tumeurs CRC KRAS mutées qui ne bénéficient encore d'aucune thérapie ciblée efficace.

Ce travail réalisé dans le contexte d'un projet toujours en cours au Laboratoire a généré des données préliminaires à retombées potentiellement innovantes qui seront explorées plus en avant afin de déterminer l'importance du stress de glycation dans la progression et la résistance.

V. Bibliographie

- (1) Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, *324* (5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- (2) Bellahcène, A.; Nokin, M.-J.; Castronovo, V.; Schalkwijk, C. Methylglyoxal-Derived Stress: An Emerging Biological Factor Involved in the Onset and Progression of Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *49*, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.05.010>.
- (3) Muthyalaiyah, Y. S.; Jonnalagadda, B.; John, C. M.; Arockiasamy, S. Impact of Advanced Glycation End Products (AGEs) and Its Receptor (RAGE) on Cancer Metabolic Signaling Pathways and Its Progression. *Glycoconj. J.* **2021**, *38* (6), 717–734. <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10031-x>.
- (4) THORNALLEY, P. J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H. S. Formation of Glyoxal, Methylglyoxal and 3-Deoxyglucosone in the Glycation of Proteins by Glucose. *Biochem. J.* **1999**, *344* (1), 109–116. <https://doi.org/10.1042/bj3440109>.
- (5) Aldini, G.; Vistoli, G.; Stefek, M.; Chondrogianni, N.; Grune, T.; Sereikaite, J.; Sadowska-Bartosz, I.; Bartosz, G. Molecular Strategies to Prevent, Inhibit, and Degrade Advanced Glycooxidation and Advanced Lipoxidation End Products. *Free Radic. Res.* **2013**, *47* (sup1), 93–137. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.792926>.
- (6) Berends, E.; van Oostenbrugge, R. J.; Foulquier, S.; Schalkwijk, C. G. Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarboxyl Compound, as a Threat for Blood Brain Barrier Integrity. *Fluids Barriers CNS* **2023**, *20* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00477-6>.
- (7) Lai, S. W. T.; Lopez Gonzalez, E. D. J.; Zoukari, T.; Ki, P.; Shuck, S. C. Methylglyoxal and Its Adducts: Induction, Repair, and Association with Disease. *Chem. Res. Toxicol.* **2022**, *35* (10), 1720–1746. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00160>.
- (8) Sousa Silva, M.; Gomes, R. A.; Ferreira, A. E. N.; Ponces Freire, A.; Cordeiro, C. The Glyoxalase Pathway: The First Hundred Years... and Beyond. *Biochem. J.* **2013**, *453* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1042/BJ20121743>.
- (9) El-Far, A. H.; Sroga, G.; Al Jaouni, S. K.; Mousa, S. A. Role and Mechanisms of RAGE-Ligand Complexes and RAGE-Inhibitors in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (10), 3613. <https://doi.org/10.3390/ijms21103613>.
- (10) Liu, Y.; Wang, X.; Yang, Y. Hepatic Hippo Signaling Inhibits Development of Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Mol. Hepatol.* **2020**, *26* (4), 742–750. <https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0178>.
- (11) Nokin, M.-J.; Durieux, F.; Peixoto, P.; Chiavarina, B.; Peulen, O.; Blomme, A.; Turtoi, A.; Costanza, B.; Smargiasso, N.; Baiwir, D.; Scheijen, J. L.; Schalkwijk, C. G.; Leenders, J.; De Tullio, P.; Bianchi, E.; Thiry, M.; Uchida, K.; Spiegel, D. A.; Cochrane, J. R.; Hutton, C. A.; De Pauw, E.; Delvenne, P.; Belpomme, D.; Castronovo, V.; Bellahcène, A. Methylglyoxal, a Glycolysis Side-Product, Induces Hsp90 Glycation and YAP-Mediated Tumor Growth and Metastasis. *eLife* **2016**, *5*, e19375. <https://doi.org/10.7554/eLife.19375>.
- (12) Alhujaily, M. Molecular Assessment of Methylglyoxal-Induced Toxicity and Therapeutic Approaches in Various Diseases: Exploring the Interplay with the Glyoxalase System. *Life* **2024**, *14* (2), 263. <https://doi.org/10.3390/life14020263>.

- (13) Compensatory mechanisms for methylglyoxal detoxification in experimental & clinical diabetes. *Mol. Metab.* **2018**, *18*, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.09.005>.
- (14) Penning, T. M. The Aldo-Keto Reductases (AKRs): Overview. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *234*, 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>.
- (15) Vander Jagt, D. L.; Hunsaker, L. A. Methylglyoxal Metabolism and Diabetic Complications: Roles of Aldose Reductase, Glyoxalase-I, Betaine Aldehyde Dehydrogenase and 2-Oxoaldehyde Dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *143–144*, 341–351. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00212-0).
- (16) Pepper, E. D.; Farrell, M. J.; Nord, G.; Finkel, S. E. Antiglycation Effects of Carnosine and Other Compounds on the Long-Term Survival of *Escherichia Coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (24), 7925–7930. <https://doi.org/10.1128/AEM.01369-10>.
- (17) Thornalley, P. J. Use of Aminoguanidine (Pimagedine) to Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419* (1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.013>.
- (18) Nokin, M.-J.; Bellier, J.; Durieux, F.; Peulen, O.; Rademaker, G.; Gabriel, M.; Monseur, C.; Charloteaux, B.; Verbeke, L.; van Laere, S.; Roncarati, P.; Herfs, M.; Lambert, C.; Scheijen, J.; Schalkwijk, C.; Colige, A.; Caers, J.; Delvenne, P.; Turtoi, A.; Castronovo, V.; Bellahcène, A. Methylglyoxal, a Glycolysis Metabolite, Triggers Metastasis through MEK/ERK/SMAD1 Pathway Activation in Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2019**, *21* (1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1095-7>.
- (19) *Rôle des mutations du gène de la polypose adénomateuse coli (APC) dans la pathogenèse du cancer colorectal; état actuel et perspectives - ScienceDirect.* <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908418303183> (accessed 2024-05-23).
- (20) Ewing, I.; Hurley, J. J.; Josephides, E.; Millar, A. The Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Frontline Gastroenterol.* **2014**, *5* (1), 26–30. <https://doi.org/10.1136/flgastro-2013-100329>.
- (21) Fearon, E. R.; Vogelstein, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **1990**, *61* (5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-l](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-l).
- (22) Pino, M. S.; Chung, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138* (6), 2059–2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- (23) Meng, M.; Zhong, K.; Jiang, T.; Liu, Z.; Kwan, H. Y.; Su, T. The Current Understanding on the Impact of KRAS on Colorectal Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *140*, 111717. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111717>.
- (24) Aghabozorgi, A. S.; Bahreyni, A.; Soleimani, A.; Bahrami, A.; Khazaei, M.; Ferns, G. A.; Avan, A.; Hassanian, S. M. Role of Adenomatous Polyposis Coli (APC) Gene Mutations in the Pathogenesis of Colorectal Cancer; Current Status and Perspectives. *Biochimie* **2019**, *157*, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.003>.
- (25) Bellier, J.; Nokin, M.-J.; Caprasse, M.; Tiamiou, A.; Blomme, A.; Scheijen, J. L.; Koopmansch, B.; MacKay, G. M.; Chiavarina, B.; Costanza, B.; Rademaker, G.; Durieux, F.; Agirman, F.; Maloujahmoum, N.; Cusumano, P. G.; Lovinfosse, P.; Leung, H. Y.; Lambert, F.; Bours, V.; Schalkwijk, C. G.; Hustinx, R.; Peulen, O.; Castronovo, V.; Bellahcène, A. Methylglyoxal Scavengers Resensitize KRAS-Mutated Colorectal Tumors to Cetuximab. *Cell Rep.* **2020**, *30* (5), 1400-1416.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.012>.

- (26) Liu, J.; Xiao, Q.; Xiao, J.; Niu, C.; Li, Y.; Zhang, X.; Zhou, Z.; Shu, G.; Yin, G. Wnt/ β -Catenin Signalling: Function, Biological Mechanisms, and Therapeutic Opportunities. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>.
- (27) Miller, J. R. The Wnts. *Genome Biol.* **2001**, *3* (1), reviews3001.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001>.
- (28) Gilbert, S. F. Induction and the Origins of Developmental Genetics. In *A Conceptual History of Modern Embryology*; Gilbert, S. F., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1991; pp 181–206. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6823-0_9.
- (29) Hsu, W.; Zeng, L.; Costantini, F. Identification of a Domain of Axin That Binds to the Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A and a Self-Binding Domain *. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (6), 3439–3445. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3439>.
- (30) MacDonald, B. T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* **2009**, *17* (1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>.
- (31) Raner, M.; Zaleska, M.; Sakalas, S.; Knight, R.; Guettler, S. Reconstitution of the Destruction Complex Defines Roles of AXIN Polymers and APC in β -Catenin Capture, Phosphorylation, and Ubiquitylation. *Mol. Cell* **2021**, *81* (16), 3246–3261.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.013>.
- (32) Trusolino, L.; Bertotti, A.; Comoglio, P. M. MET Signalling: Principles and Functions in Development, Organ Regeneration and Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (12), 834–848. <https://doi.org/10.1038/nrm3012>.
- (33) Ji, Y.; Lv, J.; Sun, D.; Huang, Y. Therapeutic Strategies Targeting Wnt/B-catenin Signaling for Colorectal Cancer (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2022**, *49* (1), 1–17. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5056>.
- (34) *Wnt signalling and its impact on development and cancer | Nature Reviews Cancer.* <https://www.nature.com/articles/nrc2389> (accessed 2024-08-17).
- (35) Kim, Y.-S.; Kang, H. S.; Jetten, A. M. The Krüppel-like Zinc Finger Protein Glis2 Functions as a Negative Modulator of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (5), 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.058>.
- (36) Orsulic, S.; Huber, O.; Aberle, H.; Arnold, S.; Kemler, R. E-Cadherin Binding Prevents β -Catenin Nuclear Localization and β -Catenin/LEF-1-Mediated Transactivation. *J. Cell Sci.* **1999**, *112* (8), 1237–1245. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.8.1237>.
- (37) Zhang, Y.; Xia, M.; Jin, K.; Wang, S.; Wei, H.; Fan, C.; Wu, Y.; Li, X.; Li, X.; Li, G.; Zeng, Z.; Xiong, W. Function of the C-Met Receptor Tyrosine Kinase in Carcinogenesis and Associated Therapeutic Opportunities. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0796-y>.
- (38) Berg, K. C. G.; Eide, P. W.; Eilertsen, I. A.; Johannessen, B.; Bruun, J.; Danielsen, S. A.; Bjørnslett, M.; Meza-Zepeda, L. A.; Eknæs, M.; Lind, G. E.; Myklebost, O.; Skotheim, R. I.; Sveen, A.; Lothe, R. A. Multi-Omics of 34 Colorectal Cancer Cell Lines - a Resource for Biomedical Studies. *Mol. Cancer* **2017**, *16* (1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0691-y>.
- (39) Segditsas, S.; Tomlinson, I. Colorectal Cancer and Genetic Alterations in the Wnt Pathway. *Oncogene* **2006**, *25* (57), 7531–7537. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210059>.

- (40) Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt Signaling in Cancer. *Oncogene* **2017**, *36* (11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>.
- (41) Christie, M.; Jorissen, R. N.; Mouradov, D.; Sakthianandeswaren, A.; Li, S.; Day, F.; Tsui, C.; Lipton, L.; Desai, J.; Jones, I. T.; McLaughlin, S.; Ward, R. L.; Hawkins, N. J.; Ruzskiewicz, A. R.; Moore, J.; Burgess, A. W.; Busam, D.; Zhao, Q.; Strausberg, R. L.; Simpson, A. J.; Tomlinson, I. P. M.; Gibbs, P.; Sieber, O. M. Different APC Genotypes in Proximal and Distal Sporadic Colorectal Cancers Suggest Distinct WNT/ β -Catenin Signalling Thresholds for Tumourigenesis. *Oncogene* **2013**, *32* (39), 4675–4682. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.486>.
- (42) Yang, J.; Zhang, W.; Evans, P. M.; Chen, X.; He, X.; Liu, C. Adenomatous Polyposis Coli (APC) Differentially Regulates β -Catenin Phosphorylation and Ubiquitination in Colon Cancer Cells *. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (26), 17751–17757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600831200>.
- (43) Albuquerque, C.; Breukel, C.; van der Luijt, R.; Fidalgo, P.; Lage, P.; Slors, F. J. M.; Leitão, C. N.; Fodde, R.; Smits, R. The ‘Just-Right’ Signaling Model: APC Somatic Mutations Are Selected Based on a Specific Level of Activation of the β -Catenin Signaling Cascade. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11* (13), 1549–1560. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.13.1549>.
- (44) Nokin, M.-J.; Durieux, F.; Bellier, J.; Peulen, O.; Uchida, K.; Spiegel, D. A.; Cochrane, J. R.; Hutton, C. A.; Castronovo, V.; Bellahcène, A. Hormetic Potential of Methylglyoxal, a Side-Product of Glycolysis, in Switching Tumours from Growth to Death. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 11722. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12119-7>.
- (45) Ebert, B.; Kisiela, M.; Wsól, V.; Maser, E. Proteasome Inhibitors MG-132 and Bortezomib Induce AKR1C1, AKR1C3, AKR1B1, and AKR1B10 in Human Colon Cancer Cell Lines SW-480 and HT-29. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *191* (1), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.12.026>.
- (46) Wu, Y.; Liu, F.; Liu, Y.; Liu, X.; Ai, Z.; Guo, Z.; Zhang, Y. GSK3 Inhibitors CHIR99021 and 6-Bromoindirubin-3'-Oxime Inhibit microRNA Maturation in Mouse Embryonic Stem Cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 8666. <https://doi.org/10.1038/srep08666>.
- (47) Abancens, M.; Harvey, B. J.; McBryan, J. GPER Agonist G1 Prevents Wnt-Induced JUN Upregulation in HT29 Colorectal Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (20), 12581. <https://doi.org/10.3390/ijms232012581>.
- (48) Aldini, G.; de Courten, B.; Regazzoni, L.; Gilardoni, E.; Ferrario, G.; Baron, G.; Altomare, A.; D’Amato, A.; Vistoli, G.; Carini, M. Understanding the Antioxidant and Carbonyl Sequestering Activity of Carnosine: Direct and Indirect Mechanisms. *Free Radic. Res.* **2021**, *55* (4), 321–330. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1856830>.
- (49) Ye, Z.; Mittag, S.; Schmidt, M.; Simm, A.; Horstkorte, R.; Huber, O. Wnt Glycation Inhibits Canonical Signaling. *Cells* **2019**, *8* (11), 1320. <https://doi.org/10.3390/cells8111320>.
- (50) Yao, Y.; Wang, X.; Zhou, D.; Li, H.; Qian, H.; Zhang, J.; Jiang, L.; Wang, B.; Lin, Q.; Zhu, X. Loss of AKR1B10 promotes colorectal cancer cells proliferation and migration via regulating FGF1-dependent pathway. *Aging* **2020**, *12* (13), 13059–13075. <https://doi.org/10.18632/aging.103393>.
- (51) Chen, Y.; Chen, M.; Deng, K. Blocking the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway to Treat Colorectal Cancer: Strategies to Improve Current Therapies (Review). *Int. J. Oncol.* **2022**, *62* (2), 24. <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5472>.

- (52) Osthus, R. C.; Shim, H.; Kim, S.; Li, Q.; Reddy, R.; Mukherjee, M.; Xu, Y.; Wonsey, D.; Lee, L. A.; Dang, C. V. Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by C-Myc *. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (29), 21797–21800. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000023200>.
- (53) *Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC* | *Science*. <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.275.5307.1787> (accessed 2024-08-21).
- (54) *Trapping of Methylglyoxal by Curcumin in Cell-Free Systems and in Human Umbilical Vein Endothelial Cells* | *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf302188a> (accessed 2024-08-21).
- (55) *Curcumin enhances dasatinib-induced inhibition of growth and transformation of colon cancer cells - Nautiyal - 2011 - International Journal of Cancer - Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.25410> (accessed 2024-08-21).