

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE N°258 Sciences – Technologies – Santé

FACULTE de MEDECINE

EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies

*Laboratoire de Physiologie Mitochondriale*

Année 2007

Thèse N°

THESE

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Christophe STENGER**

Le 21 décembre 2007

**Caractérisation moléculaire des voies apoptotiques impliquées dans la réponse à un stress hypoxique, dans des lignées de neuroblastome humain, présentant ou non un gène *TP53* muté.**

**Soutenue devant le Jury composé de :**

- Marie-Odile JAUBERTEAU, PU-PH, Université de Limoges
- Marie-Hélène RATINAUD, PU, Université de Limoges
- Francis RAUL, DR INSERM, IRCAD, Strasbourg
- Jacques ROBERT, PU-PH, Institut Bergonié, Bordeaux
- Hélène SIMONNET, MCU, Université de Lyon
- Mireille VERDIER, MCU, Université de Limoges

## REMERCIEMENTS

*Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury, Monsieur François Raul et Monsieur Jacques Robert qui ont accepté de juger ce travail. Je souhaite également dire toute ma gratitude à Marie-Odile Jauberteau qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury et enfin à Madame Hélène Simonnet et Mireille Verdier, examinateurs de ce travail.*

*Le financement de cette thèse a été intégralement assuré par le Conseil Régional du Limousin auquel j'adresse ici toute ma reconnaissance.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier Madame le Professeur Marie-Odile Jauberteau, directrice de l'EA 3842, avec qui il a été très agréable de travailler et d'échanger au cours de cette thèse, tant sur le plan scientifique qu'humain. Merci pour votre aide, notamment durant ma période « d'initiation limougeaude ».*

*Mes remerciements s'adresse maintenant et surtout à Madame le Professeur Marie-Hélène Ratinaud, qui fut incontestablement durant ces trois années, une encadrante irréprochable. Sa disponibilité, sa gentillesse et surtout sa patience ont permis de transformer ce travail de thèse en une expérience singulièrement enrichissante. Sa bonne humeur quotidienne m'a permis de garder une motivation constante. Marie-Hélène, je veux ici également vous témoigner toute ma gratitude pour l'environnement et les conditions de travail des étudiants pour lesquels vous mettez un point d'Honneur à ce qu'ils soient des plus propices à une bonne production scientifique. Je vous remercie particulièrement pour la « liberté scientifique » et pour la confiance que vous m'avez témoignée durant trois années. Grâce à vous mon regard se tourne « toujours vers le haut ».....*

*Merci à toi aussi Mireille, tu as pu (ou su) me communiquer cette gentillesse qui te caractérise bien. Un grand merci aussi pour la sollicitude que tu m'as témoignée chaque jour ainsi que l'intérêt que tu as porté à ses travaux. Renaud se joint à moi pour te saluer... 'bona domna, ab sol c'amar mi dens, ja per mentir eu no serai atens.' : Bernard de Ventadour.*

*Je souhaite remercier Capucine et Tom pour leur sympathie et avec qui j'ai partagé la vie quotidienne d'un laboratoire de recherche. Les moments passés avec vous resteront*

*d'agréables souvenirs de mon séjour dans votre région. Elodie, sincèrement, je te souhaite une belle réussite Universitaire et professionnelle, j'espère que tu te laisseras tenter par une visite en Alsace. Thomas, toi aussi tu es le bienvenu chez moi, j'essayerai de t'y communiquer aussi bien que tu as su le faire, l'Amour que je porte à ma Terre. A vous deux, bon vent.....*

*Ma sympathie s'exprime aussi envers tous mes collègues du deuxième étage, Barbara, Gaëlle, Julian, Anne-Laure, Cynthia, Lynda, Serge Battu, Fabrice Lalloué et Danielle Troutaud. Mes remerciements vont aussi à Claire Carrion pour son aide technique. Très bonne continuation à tous !*

*Je souhaite bonne chance à Ludo pour sa thèse et le reste aussi... Ta rencontre a été une bonne surprise et j'ai passé de très bons moments avec toi. Merci encore à toi et Anthony pour le « scoop » que vous m'avez fait partager..... Bon courage à la petite Joe. Je remercie ici également vivement le Docteur Faraj Terro et toute son équipe pour nos discussions scientifiques ainsi que pour son aide technique et logistique. Je te souhaite une très bonne Recherche Faraj !*

*Plus personnellement, je veux remercier tous mes amis que je laisserai malheureusement à Limoges. Manu, Steph, J.P, Antho, Vinz, Hélène et Lisa et tous les autres. Vous m'êtes cher, on garde le contact....*

*Enfin et tout spécialement, je tiens à remercier de tout mon cœur mes parents, sans lesquels ce travail de thèse n'aurait jamais pu aboutir. Merci pour votre indéfectible soutien et pour l'Amour que vous m'avez témoigné chaque jour dans les bons et les mauvais moments. Ce travail vous est intégralement dédié. Je vous dois tout. Je vous aime.*

*Mes pensées se tournent aussi vers Mémé, Pépé, Tatïe, Frédéric, Fred et Delphine et leur petit Robin qui vient de découvrir notre Monde, vers Marie-Christine et Claire courage..... Enfin, je pense à Pierre qui lira peut être ces lignes depuis sa demeure céleste....*

*Pour finir, je veux te dire Diane, à quel point tu as été, tu es et tu resteras mon rayon de soleil quotidien. Tu m'as aidé à assumer tous les évènements qui se sont présentés le long de ces trois années. J'ai pu compter sur toi. Nous avons tenu l'époque de la distance, vivons maintenant celle de la présence. Je t'aime.*

# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>20</b>
<b><i>PARTIE I : cancer, développement tumoral et p53.....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b>I. <u>De la cellule saine à la cellule cancéreuse.....</u></b>	<b>21</b>
I.1 Le processus de transformation et les mécanismes génétiques du développement tumoral.....	22
I.1.1 Les origines du processus de transformation.....	22
I.1.2 Les gènes cibles de ces modifications.....	23
I.1.2.1 Les proto-oncogènes.....	24
I.1.2.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	25
I.2 Les caractéristiques fondamentales de la cellule cancéreuse .....	26
I.2.1 Immortalité ou perte de la sénescence.....	26
I.2.2 Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération.....	27
I.2.3 Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs.....	27
I.2.4 Capacité d'induire une néoangiogenèse.....	28
I.2.5 Echappement à l'apoptose.....	28
I.2.6 Capacité d'invasion et de métastase.....	28
I.2.7 La résistance.....	29
<b>II. <u>La protéine p53 : régulation et fonctions biologiques.....</u></b>	<b>30</b>
II.1 Structure et régulation de la protéine p53.....	31

II.1.1	Structure protéique.....	31
II.1.2	Régulation de p53.....	32
II.1.2.1	Régulation « classique » de stabilité via HDM2.....	32
II.1.2.2	Les nouvelles hypothèses de la régulation fonctionnelle de p53.....	33
II.1.2.3	Régulation de l'activité de p53 : l'importance des phosphorylations.....	35
II.1.2.3.1	<i>Phosphorylations au niveau N-Terminal.....</i>	36
II.1.2.3.2	<i>Phosphorylations au niveau C-Terminal.....</i>	38
II.2	Les fonctions biologiques de la protéine p53.....	39
II.2.1	L'arrêt du cycle cellulaire.....	39
II.2.2	p53 et son dans le métabolisme cellulaire.....	41
II.2.2.1	Le suppresseur de tumeur p53 et le métabolisme énergétique.....	41
II.2.2.2	Implication de p53 dans la différenciation.....	43
II.3	p53 et cancers.....	43
II.3.1	Les mutations et les mutants de p53.....	44
II.3.2	Les phosphorylations des mutants de p53.....	45
II.3.3	Le cas particulier de p53 dans les neuroblastomes.....	46

## ***PARTIE II : Apoptose et mécanismes de régulations.....48***

I.	<u>Caractéristiques principales de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie..</u>	51
I.1	L'apoptose.....	51
I.2	La nécrose.....	52
I.3	L'autophagie.....	53
II.	<u>Les acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de l'apoptose.....</u>	55
II.1	Les régulateurs de l'apoptose : la famille bcl-2.....	55

II.1.1 Généralités sur les membres de la famille Bcl-2.....	55
II.1.2 Structures des protéines de la famille Bcl-2.....	56
II.1.2.1 Les membres pro-apoptotiques.....	57
II.1.2.2 Les membres anti-apoptotiques.....	57
II.1.2.3 Les membres « BH3 only ».....	57
II.1.3 Régulation fonctionnelle des protéines de la famille bcl-2..	58
II.1.3.1 Concept initial de dimérisation .....	58
II.1.3.2 Par phosphorylation.....	59
II.1.3.3 Par clivage.....	60
II.1.3.4 Les isoformes protéiques.....	60
II.2 Les effecteurs de l'apoptose : les capsases.....	61
II.2.1 Classification fonctionnelle des caspases.....	61
II.2.2 Structure et activation enzymatique des procaspases.....	63
II.2.3 Quelques exemples types de substrats de caspases.....	64
II.3 Les inhibiteurs de l'apoptose : l'exemple des IAPs.....	65
III. <u>Les voies de signalisations apoptotiques.....</u>	67
III.1 La voie apoptotique « extrinsèque » voie des récepteurs de mort...	67
III.1.1 Recrutement de la voie des récepteurs de mort.....	68
III.1.2 Transduction du signal apoptotique.....	68
III.1.3 Régulation de la voie « extrinsèque » .....	70
III.2 La voie apoptotique « intrinsèque » ou voie mitochondriale.....	70
III.2.1 La perméabilisation de la MOM.....	70
III.2.1.1 Le pore de transition de perméabilité membranaire	70
III.2.1.2 Les protéines de la famille Bcl-2.....	73
III.2.2 Les agents pro-apoptotiques libérés de la mitochondrie....	75
III.2.2.1 Le cytochrome <i>c</i> .....	75
III.2.2.2 L'AIF.....	76
III.2.2.3 Smac/Diablo.....	76
III.2.2.4 omi/HtrA2.....	76

IV. <u>L'implication de p53 dans la réponse apoptotique</u> .....	77
IV.1 Le contrôle par p53 de la voie indépendante des récepteurs de mort (or voie mitochondriale).....	77
IV.1.1 Inhibition des protéines anti-apoptotiques.....	78
IV.1.2 Activation de protéines pro-apoptotiques.....	78
IV.2 p53 et le contrôle de la voie des récepteurs de mort.....	79
IV.2.2.1 Inhibition des protéines anti-apoptotiques.....	79
IV.2.2.2 Activation de protéines pro-apoptotiques.....	79
V. Interconnexions des voies dépendantes ou indépendantes des récepteurs de mort.....	81

## ***PARTIE III : Hypoxie et implication de p53 dans l'élaboration de la réponse cellulaire adaptative.....83***

I. <u>Hypoxie : causes, signalisation et effets sur la survie des cellules cancéreuses et la progression tumorale</u> .....	85
I.1 Les causes de l'hypoxie.....	85
I.1.1 L'hypoxie physiologique.....	85
I.1.2 L'hypoxie pathologique.....	86
I.2 Les voies de signalisations induites par l'hypoxie et leurs conséquences.....	87
I.2.1 HIF-1, chef d'orchestre de la réponse cellulaire à l'hypoxie..	87
I.2.1.1 Structure de HIF-1.....	87
I.2.1.2 Régulation de la stabilité de HIF-1 $\alpha$ .....	89
I.2.2 Effets sur les cellules cancéreuses et la croissance tumorale..	90
I.2.2.1 HIF-1 dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses.....	91

I.2.2.2 HIF-1 et augmentation de l'agressivité tumorale.....	91
I.2.2.3 HIF-1 et résistance pluri-drogues des cellules cancéreuses.....	92
I.3 Modèle <i>in vitro</i> de l'hypoxie.....	93
I.3.1 Hypoxie physiologique.....	93
I.3.2 Hypoxie chimique.....	93
I.3.2.1 Le chlorure de cobalt.....	93
I.3.2.2 La desferoxamine.....	94
I.3.3. Les limites des modèles <i>in vitro</i> de l'hypoxie.....	94
I.3.3.1 Le chlorure de cobalt.....	94
I.3.3.2 La desferoxamine.....	95
II. <u>p53 et l'hypoxie</u> .....	95
II.1 Stabilisation de p53 durant le stress hypoxique.....	95
II.2 Interaction entre p53 et HIF-1 $\alpha$ au cours du stress hypoxique.....	96
II.3 Signification biologique de cette interaction.....	97
III. <u>La régulation par p53 de l'apoptose induite par un stress hypoxique</u> .....	98
III.1 La détection.....	98
III.2 Bilan de la redistribution de p53 dans les compartiments cellulaire.....	98
III.2.1 La mitochondrie.....	98
III.2.2 Le noyau.....	98
III.2.3 Le cytoplasme.....	99

## **RESULTATS.....100**

### ***CHAPITRE 1 : Caractérisation des effets apoptogènes du CoCl<sub>2</sub> dans des lignées de neuroblastome humain : cinétique d'action et régulation de p53..... 103***

I. <u>Article 1 : Implication de p53 dans la réponse apoptotique induite par le chlorure de cobalt</u> .....	103
II. <u>Autres voies de signalisations induites par le traitement au CoCl<sub>2</sub></u> .....	106
II.1 Activation de la voie des MAPK/Erk.....	106
II.2 Activation de la voie des SAPK/Jnk.....	107
II.3 Conclusion de l'article 1.....	108

***CHAPITRE 2 : Etude des effets de l'extinction de p53 par ARNi sur l'apoptose induite par le CoCl<sub>2</sub> dans la lignée de neuroblastome humain SHSY5Y.....109***

I. <u>Article 2 : Signalisation de mort alternative à p53 après 500 µM CoCl<sub>2</sub></u> .....	109
II. <u>Article 2 : Implication de la caspase-8 et de tBid dans l'apoptose induite par le CoCl<sub>2</sub></u> .....	112

***CHAPITRE 3 : Induction de l'apoptose par la desferoxamine (DFO), un autre mimétique de l'hypoxie, dans la lignée SHSY5Y.....113***

I. <u>Intérêt de ce travail</u> .....	113
II. <u>Méthodologies</u> .....	114
II.1 Caractéristiques physico-chimiques de la DFO.....	114
II.2 Détermination de la cytotoxicité de la desferoxamine.....	114
II.3 Détection qualitative de la fragmentation de l'ADN par TUNEL...	115

II.4	Quantification de la fragmentation de l'ADN par <i>TUNEL</i> et cytométrie.....	115
III.	<u>Résultats</u> .....	116
III.1	Cytotoxicité de la desferoxamine.....	116
III.2	Traitement à la DFO et p53.....	117
III.3	Traitement à la DFO et protéine pro-apoptotique Bax.....	118
III.3.1	Accumulation de Bax dans les <i>SHSY5Y</i> traitées avec DFO500µM.....	118
III.3.2	Bax est localisé à la mitochondrie.....	118
III.4	Les évènements mitochondriaux et nucléaires induisent l'apoptose.....	119
III.4.1	Détection qualitative de la fragmentation de l'ADN par <i>TUNEL</i> .....	119
III.4.2	Détection quantitative de la fragmentation de l'ADN par <i>TUNEL</i> .....	120
III.5	Induction de la voie MAPK/Erk par la DFO.....	120
IV.	<u>Discussion</u> .....	121

**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....124**

**BIBLIOGRAPHIE.....132**

**ANNEXES.....153**

## **ABBREVIATIONS**

# ABREVIATIONS

Ci-dessous sont décrits les termes généraux d'usage ainsi que les abréviations présentes sur les figures. Les autres ont été définis dans le texte ou directement en bas de page afin de faciliter la lecture du document.

<b>Abl</b>	<b>A</b> bleson leukemia oncogene cellular homolog
<b>ADN</b>	<b>A</b> cide DesoxyriboNucléique
<b>Akt</b>	<b>A</b> KT8 virus oncogene cellular homolog
<b>ARNm</b>	<b>A</b> cide ribonucléique messenger
<b>Bid</b>	<b>B</b> H3-only death agonist protein
<b>CaMK</b>	<b>C</b> alcium/Calmodulin-dependent Kinase
<b>cAMP</b>	<b>C</b> yclic Adenosine MonoPhosphate
<b>Cdc</b>	<b>C</b> ell Division Control protein
<b>Chk</b>	<b>C</b> heckpoint Kinase
<b>c-IAP</b>	<b>C</b> ellular-Inhibitor of Apoptosis Protein
<b>c-myc</b>	<b>A</b> vian MYeloCytomatosis virus oncogene cellular homolog
<b>CREB</b>	<b>c</b> AMP Response Element-Binding protein
<b>E2F</b>	<b>T</b> ranscription factor E2F
<b>eEF</b>	<b>e</b> ukaryotic Elongation Factor
<b>Erk</b>	<b>E</b> xtracellular signal-Regulated Kinase
<b>Fas</b>	<b>T</b> NF superfamily receptor 6
<b>HDAC</b>	<b>H</b> istone DesACetylase
<b>HSP</b>	<b>H</b> eat Shock Protein
<b>IKK</b>	<b>I</b> κB Kinase
<b>IκB</b>	<b>I</b> nhibitor of NFκB
<b>JNK</b>	<b>J</b> anus N-terminal Kinase
<b>MAPK</b>	<b>M</b> itogen-Activated Protein Kinase
<b>MEK</b>	<b>M</b> APK/Erk Kinase
<b>NFκB</b>	<b>N</b> uclear transcription factor κB
<b>P</b>	<b>P</b> hosphate
<b>PKC</b>	<b>P</b> rotein Kinase C
<b>PLC</b>	<b>P</b> hosphoLipase C
<b>PP2A</b>	<b>P</b> hospho-protein Phosphatase 2A
<b>SAPK</b>	<b>S</b> tress-Activated Protein Kinase
<b>Src</b>	<b>R</b> ous Sarcoma oncogene Cellular homolog
<b>Ub</b>	<b>U</b> biquitine

## **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1 : Illustrations des modifications morphologiques et fonctionnelles lors de la transformation.
- Figure 2 : Amplification d'un ou plusieurs gènes
- Figure 3: Activation d'un proto-oncogène
- Figure 4: Structure et domaines fonctionnels de p53.
- Figure 5: Acétylations et SUMOylation de p53 à l'extrémité C-Terminale.
- Figure 6: Phosphorylations de l'extrémité N-Terminale de p53 par de nombreuses kinases.
- Figure 7: Phosphorylations de l'extrémité C-Terminale de p53 par de nombreuses kinases.
- Figure 8 : Implications fonctionnelles principales de p53.
- Figure 9 : Contrôle par p53 de l'arrêt du cycle cellulaire.
- Figure 10 : Métabolisme énergétique préférentiel des cellules cancéreuses.
- Figure 11 : Sites de mutations fréquents de la protéine p53
- Figure 12 : Les gènes impliqués dans l'apoptose chez *C. elegans* et leurs orthologues chez les mammifères.
- Figure 13: Photographie de microscopie électronique d'une cellule en apoptose.
- Figure 14 : Photographie de microscopie électronique d'une cellule en nécrose.
- Figure 15 : Photographie de microscopie électronique d'une cellule présentant une autophagie intensive.
- Figure 16 : Représentation schématique de la structure de différents membres de la famille Bcl-2.
- Figure 17: Représentation schématique du modèle de « rhéostat » moléculaire.
- Figure 18A : Structure protéique et classification des procaspases.
- Figure 18B : Activation des procaspases
- Figure 19 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels présents sur les IAPs.
- Figure 20 : Principe de l'activation de la voie apoptotique « extrinsèque ».
- Figure 21: Le complexe de pore mitochondrial.
- Figure 22: Modèles de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe
- Figure 23 : Hypothèses actuelles du contrôle de l'initiation de la voie intrinsèque et de l'induction de l'apoptose.
- Figure 24 : Modèle moléculaire de la formation de l'apoptosome et de l'activation de la procaspase 9.
- Figure 25: Modèles généraux décrivant les principales activités pro-apoptotiques de p53
- Figure 26: Activité mitochondriale et cytosolique pro-apoptotique de p53.
- Figure 27 : Les complexes multiprotéiques de la mort cellulaire
- Figure 28: Résumé des voies apoptotiques indépendantes des récepteurs de mort et leurs interconnexions avec la voie des récepteurs de mort.
- Figure 29 : Les différents stades de développement d'une tumeur.
- Figure 30 : Développement de zones hypoxiques lors de la croissance tumorale.
- Figure 31 : Structure et domaines fonctionnels des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du facteur de transcription HIF-1.
- Figure 32 : Mécanismes de dégradation de HIF-1 $\alpha$  en normoxie et sa stabilisation en conditions hypoxiques.
- Figure 33 : Modèle décrivant la cinétique inverse d'accumulation de p53 et d'HIF-1 $\alpha$  durant l'hypoxie.
- Figure 34: Cultures de lignées de neuroblastome humains.

**Figure 35:** Activation de la voie MAPK/Erk après traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  dans les deux lignées de neuroblastome.

**Figure 36 :** Activation de la voie SAPK/JNK après traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  dans les deux lignées de neuroblastome.

**Figure 37 :** Formule développée de la desferoxamine mesylate (DFO)

**Figure 38 :** Effet cytotoxique de la DFO sur la lignée *SHSY5Y*.

**Figure 39 :** p53 est stabilisé et phosphorylé sur la sérine 15 puis relocalisée dans le noyau après traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de DFO.

**Figure 40 :** Induction et accumulation de Bax dans les cellules *SHSY5Y* après traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de DFO.

**Figure 41 :** La fragmentation de l'ADN après un traitement à la DFO.

**Figure 42:** Quantification par cytométrie du marquage TUNEL après traitement des *SHSY5Y* par la DFO.

**Figure 43:** La voie MAPK/Erk est induite dans les *SHSY5Y* après traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de DFO.

**Tableau 1A et 1B :** Quelques oncogènes (en gris) et gènes suppresseurs de tumeurs (en blanc) et les cancers associés à leur mutations.

**Tableau 2 :** Principales conséquences biologiques des mutations les plus fréquentes de p53.

**Tableau 3 :** Evènements associés aux morts cellulaires les plus courantes.

**Tableau 4 :** Quelques substrats des caspases au cours de l'apoptose.

# **INTRODUCTION GENERALE**

Le cancer, est devenu la première cause de mortalité en France<sup>1</sup>, devant les maladies cardiovasculaires, les accidents et les pathologies neurodégénératives. L'étude et la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'apparition et le développement des tumeurs restent, par conséquent, un domaine de recherche privilégié. Les causes majeures d'apparition des cancers sont assez bien déterminées (tabac, alcool, alimentation...). Toutefois, les processus cellulaires engendrant la prolifération et la résistance des cellules cancéreuses, demeurent encore un axe de recherche majeur afin de détecter de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. Les résultats des études mécanistiques menées sur ces processus, démontrent l'hétérogénéité des acteurs moléculaires et des voies de transduction impliqués, en fonction du type de cancer ou de son stade de développement au moment du diagnostic. Néanmoins, l'étiologie de l'établissement d'un phénotype cellulaire tumoral repose sur la rupture d'un équilibre entre prolifération et mort(s) cellulaire(s). Cette rupture aboutit à une perte de contrôle de l'homéostasie cellulaire et induit l'apparition de pathologies. En effet, lorsque l'indice de prolifération devient supérieur au nombre de cellules mourantes, on parle prolifération anarchique et donc de cancer, alors que dans le cas inverse, lorsque la mort est prédominante, on peut observer des maladies dites dégénératives (Alzheimer...). Ainsi, le contrôle de la mort cellulaire est un élément clé dans le maintien de l'homéostasie des tissus et dans le développement de pathologies.

L'apoptose, est habituellement définie comme le processus de mort cellulaire indispensable par exemple, durant l'embryogenèse, au cours de la sélection des cellules immunitaires auto-réactives ou encore pour l'établissement de la plasticité cérébrale dans le processus de mémorisation. Cependant, c'est bien la perte de son contrôle ou son inhibition, qui participe largement au développement initial des tumeurs. Le processus apoptotique est régulé par de nombreuses protéines, souvent liées dans des voies de signalisation intracellulaires finement régulées et interdépendantes. En effet, l'intégration du signal de stress, l'élaboration d'une réponse cellulaire adaptée et enfin l'exécution du programme de mort, sont autant de processus soumis au contrôle de nombreux acteurs moléculaires. Parmi ceux-ci, la protéine p53, fait maintenant partie des régulateurs majeurs de ces processus.

---

<sup>1</sup> Selon une étude du Centre d'Epidémiologie sur les Causes Médicales de Décès. Données publiées dans le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (BEH) du 18 septembre 2007.

Cette dernière est codée par le gène *TP53*, et présente fréquemment dans les cellules cancéreuses une stabilité et/ou une activité accrue ou se retrouve inactivée. Initialement, p53 a été décrite pour être impliquée dans le contrôle de l'intégrité de l'ADN, les mécanismes de réparation, la régulation de la progression dans le cycle cellulaire. Plus récemment, son rôle dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose a été établi. En effet, non seulement c'est un « intégrateur » du signal de stress, mais p53 remplit également un rôle d'« effecteur » à part entière, dans la signalisation de mort. Sa régulation est principalement basée sur des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, ubiquitinylation, acétylations...), assurées par de nombreuses voies de signalisations. Les mutations de p53, retrouvées dans la majorité des tumeurs (plus de 60 %), provoquent l'inactivation des voies de contrôle et d'initiation de la mort cellulaire. De plus, les protéines p53 mutées acquièrent couramment de nouvelles fonctions leur permettant d'interagir avec des facteurs de transcriptions. Ceci a pour conséquence, l'expression inadéquate de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, ou la transduction de signaux de survie, résultant en une prolifération excessive et incontrôlée.

Dans le cas de tumeurs solides, les altérations génétiques et métaboliques acquises peuvent être amplifiées par le microenvironnement de la tumeur. C'est le cas du stress hypoxique. En effet, lorsqu'une masse tumorale atteint un certain volume, les cellules cancéreuses constituant la partie centrale de la tumeur ne sont plus suffisamment oxygénées et meurent. Toutefois certaines d'entre elles, développent un métabolisme préférentiellement anaérobie, leur permettant de survivre. Le manque d'oxygène entraîne la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur de réponse à l'hypoxie HIF-1. Celui-ci induit l'expression de gènes codant pour des transporteurs du glucose, des enzymes de la glycolyse, des facteurs angiogéniques ou des facteurs de croissance. Cela permet l'adaptation de la cellule à son environnement hypoxique et par conséquent sa survie. Le profil d'expression génétique induit par l'hypoxie rend les cellules plus agressives, plus prolifératives et plus résistantes aux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie.

Dans le cas, d'une tumeur solide fréquemment observée chez le jeune enfant, le neuroblastome, l'hypoxie provoque la différenciation des cellules tumorales et l'expression de facteurs de prolifération et de dissémination. De façon générale, le degré d'hypoxie d'une tumeur est directement corrélé à un mauvais pronostic clinique. C'est

pourquoi, comprendre la signalisation de mort induite des cellules au cours de l'hypoxie, permettra potentiellement de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif de notre travail a été d'explorer les mécanismes moléculaires liés à la signalisation de mort dans des lignées de neuroblastome humain. Le processus y a été induit par un stress hypoxique suite à l'exposition *in vitro* des cellules, au chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>), une molécule mimétique de l'hypoxie. Le rôle de p53 dans cette signalisation apoptotique a également été étudié, notamment au travers de certains de ses états de phosphorylation et de leur localisation intracellulaire.

Après une introduction bibliographique, les résultats obtenus seront décrits sous forme d'articles. Le premier correspond à l'analyse de la réponse de mort impliquant p53, induite par traitement au CoCl<sub>2</sub> dans deux lignées de neuroblastome humain. Il s'agit de la lignée *SHSY5Y* (possédant un allèle sauvage du gène *TP53*) et de la lignée *SKNBE(2c)* (portant un allèle *TP53* muté, donnant naissance à une protéine p53 transcriptionnellement inactive). La signalisation moléculaire de mort induite dans les deux lignées a été caractérisée. Le deuxième article (en préparation), présente les conséquences moléculaires de l'inactivation de p53 par l'ARN interférence (ARNi), sur la signalisation de mort induite par le cobalt.

Enfin, dans la troisième partie des résultats, nous exposerons les données préliminaires obtenues lors de l'induction *in vitro* de la mort cellulaire par une autre molécule mimétique de l'hypoxie : la desferoxamine (DFO). Ces résultats semblent faire apparaître des différences dans la réponse et la signalisation de mort dans les lignées de neuroblastome étudiées.

Pour conclure, nous présenterons les principales perspectives, ainsi que les expérimentations potentielles à envisager, afin de caractériser davantage l'implication de p53 dans la réponse cellulaire à l'hypoxie.

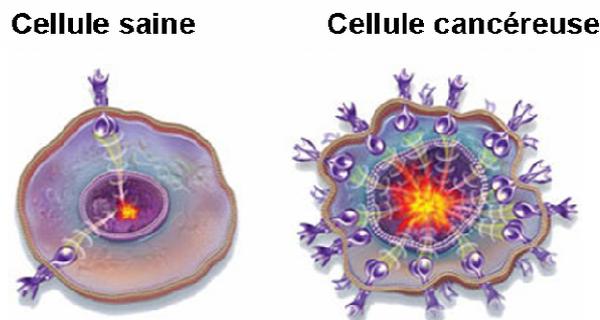
# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

# PARTIE I : Cancer, développement tumoral et p53

Cette partie sera consacrée dans un premier temps à la description du concept de cancer, puis seront détaillées les principales caractéristiques de la cellule cancéreuse entraînant des changements majeurs de la physiologie cellulaire. Ceux-ci provoquent à leur tour, au niveau tissulaire, l'apparition d'un microenvironnement particulier. Il s'agit par exemple, d'une vascularisation accrue, d'une augmentation du volume de l'organe correspondant ou encore d'une hypoxie. Cette dernière, ainsi que les stratégies de survie de la cellule cancéreuse, seront plus amplement détaillées dans la **partie III**. En effet, le travail réalisé ayant porté sur l'étude du contrôle et de l'exécution de la mort cellulaire, dans des lignées de cellules cancéreuses humaines en condition de stress hypoxique.

## I. De la cellule saine à la cellule cancéreuse

A l'heure où la notion de 'vaccin anti-cancer' suscite de grands espoirs pour certains types de cancers d'origines infectieuses (Harper et al, 2004), la majorité d'entre eux restent toujours un problème majeur de santé publique. Le processus d'oncogenèse nécessite de nombreuses modifications dans la physiologie cellulaire, processus appelé transformation, correspondant à l'acquisition de propriétés caractéristiques des cellules cancéreuses (**figure 1**). Les évènements à l'origine de l'initiation du processus de cancérogenèse, ainsi que les mécanismes moléculaires de contrôle de prolifération, de dissémination, de résistance des cellules cancéreuses aux drogues de chimiothérapies, restent toujours des axes de recherches primordiaux pour une meilleure prise en charge thérapeutique.



**Figure 1 : Illustrations des modifications morphologiques et fonctionnelles lors de la transformation.**

(Adapté du site d'informations [www.targetedtherapy.info](http://www.targetedtherapy.info))

## I.1 Le processus de transformation : origines et mécanismes génétiques du développement tumoral.

### I.1.1 Les origines du processus de transformation

Il est maintenant établi que le passage de cellules humaines normales en cellules cancéreuses implique de nombreuses altérations génétiques qui se succèdent au cours d'un processus appelé transformation. Ces changements résultent de l'exposition à des substances cancérigènes d'origine chimiques, physiques ou endogènes. Les molécules chimiques telles que les agents alkylants, les métaux lourds, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les nitrosamines sont responsables de nombreux dommages à l'ADN. D'autres agents, tels que les rayonnements UV, les rayonnements gamma et X, le tabac ou l'exposition à des insecticides sont également responsables d'atteintes génétiques ou épigénétiques (Hahn et al., 1999). Fréquemment, les sous-produits du métabolisme cellulaire, comme les radicaux libres, mais également certaines infections virales ou bactériennes sont aussi reconnus comme des éléments carcinogènes. Les modifications du contrôle de l'expression de gènes ou de l'activité des protéines correspondantes aboutissent à la sélection progressive de cellules. Elles acquièrent des capacités particulières de prolifération, d'adaptation à l'environnement et de survie. Ces lésions irréversibles de l'ADN, sont en grande majorité somatiques et spécifiquement présentes dans les cellules tumorales (Houghton et al, 2007). Dans de rares cas de syndrome de prédispositions héréditaires aux cancers une mutation originelle ou constitutionnelle, est présente dans la lignée germinale. Pour que la mutation soit « fixée », c'est-à-dire qu'elle se maintienne dans le génome au cours des divisions cellulaires, celle-ci doit apporter un avantage de prolifération ou de résistance par rapport aux cellules saines. C'est pourquoi, les gènes stimulant la prolifération cellulaire ou codant pour des facteurs anti-apoptotiques (proto-oncogène<sup>2</sup>), et ceux inhibant la croissance ou induisant la mort cellulaire (gènes suppresseurs de tumeur<sup>3</sup>), sont fréquemment touchés par les événements mutationnels.

Durant une phase dite, d'*initiation* de contact avec le carcinogène, les cellules ayant subi une mutation dans leur génome sont appelées : cellules pré-néoplasiques et ne sont pas encore transformées. En effet, elles peuvent, ne pas exprimer le phénotype de la mutation acquise, durant toute leur vie. Néanmoins, les mécanismes de *promotion* de la carcinogenèse

---

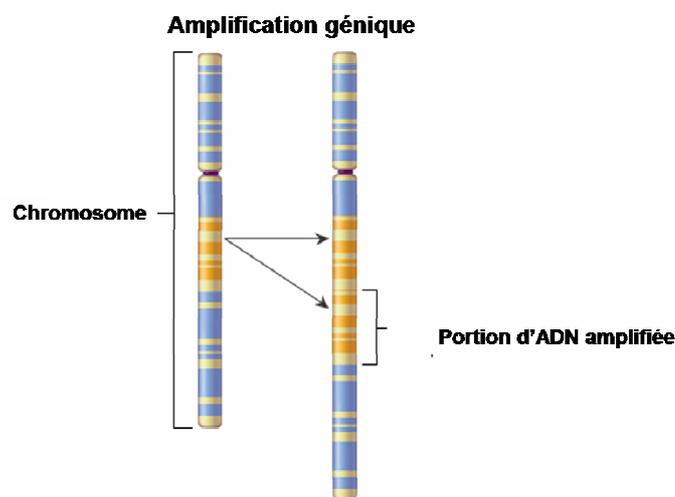
<sup>2</sup> Gènes impliqués dans des processus de survie ou de prolifération, notion discutée plus bas dans cette partie

<sup>3</sup> Gènes impliqués dans des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et de la mort, discutés également ci-après

dépendent du type de mutations (translocation, amplification, locus génétique de l'intégration virale) apparu dans un gène et de la fonction du produit de l'expression de celui-ci (contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose, facteurs trophiques...). Enfin, le passage de l'état d'une cellule « initiée » en cellule cancéreuse, marque le début de la *progression*, étape de la carcinogénèse dans laquelle la croissance cellulaire devient autonome (Rando T. A., 2007). Ceci entraîne l'apparition de nouvelles mutations, dites spontanées, qui s'expliquent par le fait que, des cellules en prolifération, sont plus exposées que des cellules quiescentes, à des erreurs de réplication de l'ADN. En outre, des mutations acquises au stade *initiation*, touchant fréquemment des gènes codant pour des enzymes de réparation de l'ADN, induisent une instabilité génétique encore plus grande. L'« activation » des altérations génétiques ainsi que les avantages de prolifération et de survie entraînent l'apparition et le développement de tumeur.

### I.1.2 Les gènes cibles de ces modifications

Comme mentionné plus haut, au contact répété d'une substance carcinogène, des mécanismes génétiques particuliers bouleversent de manière durable l'expression de gènes. Ces mécanismes peuvent être des erreurs de copies non réparées, se produisant au niveau de bases modifiées lors de la réplication de l'ADN. Celles-ci provoquent l'apparition de mutations ponctuelles dans la séquence nucléotidique. Des processus d'amplification génique (**figure 2**) ou de translocations (**figure 3**) sont aussi fréquemment associés au processus de transformation, provoquant une expression accrue du gène ou l'augmentation de l'activité de la protéine qu'il code.



**Figure 2 : Amplification d'un ou plusieurs gènes**

(Document public NIH, adapté)

Enfin, des méthylations de régions promotrices régulatrices, ainsi que l'apport de matériel exogène d'origine virale peuvent également être à l'origine d'une dérégulation du contrôle de l'expression génique.

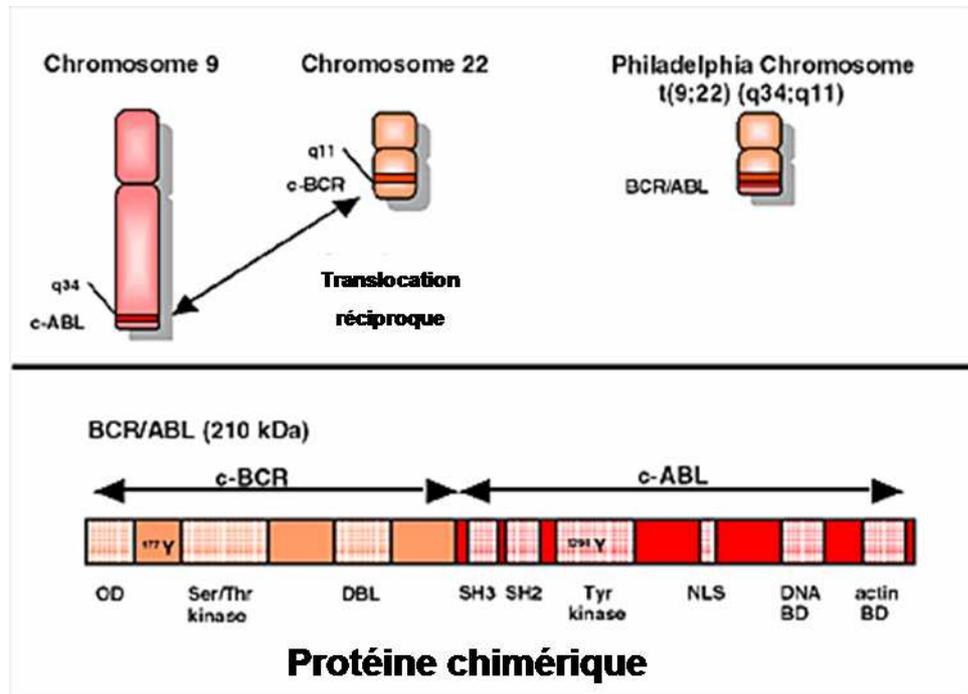


Figure 3: Activation d'un proto-oncogène

Schéma illustrant le mécanisme de translocation réciproque aboutissant à une protéine chimérique BCR/ABL dans le cas de la leucémie myéloïde chronique. NLS : Signal de localisation nucléaire, DNA BD : Domaine de liaison à l'ADN, Actin BD : Domaine de liaison à l'actine.

(Adapté de James Griffin, 2005)

Les gènes ciblés (**tableau 1A et 1B**) par ces altérations induites sont souvent (voire toujours), fortement impliqués dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire (Land et al., 1983 ; Klein G., 1987). Il s'établit un équilibre permanent entre facteurs stimulateurs (protéines codées par des proto-oncogènes) et des facteurs inhibiteurs ou de mort cellulaire (protéines codées par les gènes suppresseurs de tumeurs). Toute rupture de cet équilibre peut conduire à la formation d'une tumeur.

### 1.1.2.1 Les proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes qui participent à la transformation maligne lorsqu'ils sont mal ou plus du tout régulés. L'expression accrue du gène ou l'augmentation de l'activité de la protéine codée, qui transforme un proto-oncogène en oncogène, peut résulter soit d'une altération structurale directe du gène, soit d'une régulation par des éléments génétiques transactivateurs. La plupart des proto-oncogènes, codent pour des

récepteurs de facteurs trophiques (EGFR<sup>4</sup>) ou des facteurs de transcriptions (c-erb-B2, c-myc), ou des kinases impliquées dans les voies de signalisation de facteurs de croissances (c-H-ras, c-N-ras). Des mutations activatrices mono-alléliques, sont suffisantes pour entraîner une activation exagérée de la prolifération cellulaire.

GENES :	CODANT POUR :	IMPLICATION FREQUENTES EXEMPLE DE CANCERS :
EGF	Epidermal Growth Factor: facteur de croissance	Carcinomes
Erb-B	Récepteur à l'EGF	Glioblastome
Erb-B2 ou HER-2	Récepteur à l'EGF et autres facteurs trophiques	Seins et ovaires
Ret	Récepteur de Facteurs de croissances	Majoritairement thyroïde
N-ras	Protéines voies des MAPK	Leucémies
c-myc	Activateurs transcriptionnels	Leucémies, poumons, seins, estomac
N-myc	Activateurs transcriptionnels	Neuroblastome, glioblastome
L-myc	Activateurs transcriptionnels	Poumon
Bcl-2	Protéine anti-apoptotique	Lymphome B
MDM2	Antagoniste de p53	Nombreuses tumeurs et majoritairement sarcomes

**Tableau 1A : Quelques oncogènes et les cancers associés à la perte du contrôle de leur expression.**

### *1.1.2.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs*

Les gènes suppresseurs de tumeurs (ou anti-oncogènes) comprennent les gènes dont l'inactivation est impliquée dans le processus de transformation maligne. Ils codent souvent pour des protéines régulant négativement la progression du cycle cellulaire et contrôlant l'intégrité du génome (Rb<sup>5</sup>, p53). Des gènes codant pour enzymes de réparation de l'ADN tels que *msh2* et *mts1* sont fréquemment inactivés par hyperméthylation ou insertion mutationnelle. Contrairement aux proto-oncogènes, la perte de l'activité du produit des deux allèles est généralement nécessaire pour déréguler le contrôle de la prolifération cellulaire. Dans le cas où la perte d'une seule copie du gène suppresseur de tumeur favorise l'apparition de cancer, on parle d'haplo-insuffisance.

<sup>4</sup> EGFR : Epithelium Growth Factor Receptor

<sup>5</sup> Rb : Retinoblastoma protein

GENES :	CODANT POUR :	IMPLICATION FREQUENTES EXEMPLE DE CANCERS :
APC	Voie de contrôle de la prolifération cellulaire	Colon et estomac
NF-2	Contrôle des voies de prolifération avec PTEN un autre gène suppresseur de tumeur	Meningiome, épendymome, schwannome
MTS-I	Code pour p16, inhibiteur principal du cycle cellulaire	Multiples cancers
Rb	Code pour Rb, inhibiteur secondaire du cycle cellulaire	Rétinoblastome, ostéosarcome, cancer du poumon à petites cellules, vessie
p53	Contrôle de l'ADN, et initiation de l'apoptose, métabolisme énergétique	> 60 % des cancers
BRCA-1, BRCA-2	Molécule inhibitrice de la croissance	Seins et ovaires (pour BRCA-1)
VHL	Molécule de contrôle de la prolifération	Rein surtout

**Tableau 1B : Quelques gènes suppresseurs de tumeurs et les cancers associés à leur mutation.**

## **I.2 Les caractéristiques fondamentales de la cellule cancéreuse**

La transformation aboutit à l'acquisition par la cellule de caractéristiques particulières, retrouvées chez toutes les cellules cancéreuses. Si nous ne pouvons définir exactement quelles mutations ou pertes de gènes sont nécessaires et suffisantes à l'oncogenèse, les travaux de Weinberg (1982) suggéraient que les cellules transformées présentent en commun au moins six caractéristiques. Il s'agit de l'immortalité, l'indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la capacité d'induire la néo-angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose et la capacité à l'invasion à distance (métastases). A ces caractéristiques, il faudra ajouter celle de la résistance aux drogues et aux radiations, qui sont acquises rapidement par les cellules transformées. Nous allons maintenant détailler chacune de ces caractéristiques.

### **I.2.1 L'immortalité ou perte de la sénescence**

Elle définit la capacité des cellules cancéreuse à proliférer de manière illimitée. Dans le cas d'une cellule saine, le nombre de division cellulaire est limité. Après un certain nombre de génération, la cellule entre en sénescence et puis meurt par apoptose. Ce processus est sous la dépendance d'un système de détection et de contrôle de la longueur des

télomères. En effet, le lien entre le raccourcissement des télomères et la sénescence répllicative est bien établi (Londono-Vallejo J. A., 2007). Pour contourner la limitation imposée par le raccourcissement des télomères, les cellules cancéreuses possèdent deux mécanismes connus. Il s'agit pour l'un de la réactivation de la télomérase (de type transcriptase inverse) permettant la synthèse *de novo* de séquences télomériques et le maintien de la longueur des extrémités des chromosomes. Son activité est détectée dans 85 % des tumeurs étudiées. L'autre, beaucoup moins connu, est un mécanisme alternatif indépendant de la télomérase connu sous le terme d'ALT<sup>6</sup> (Muntoni et al, 2005). Le maintien des longueurs des télomères semble impliquer, dans ce cas, des évènements de recombinaison nécessitant des protéines de recombinaison telles que RAD50 et RAD52. Ces évènements de recombinaisons, ainsi que des cytodières asymétriques seraient à l'origine du maintien des capacités répliquatives des cellules transformées.

### I.2.2 Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération

La cellule transformée présente une capacité de prolifération exagérée, stimulée de façon non physiologique. Les mécanismes par lesquels la cellule cancéreuse parvient à cet état sont variables. Parmi les plus fréquents on retrouve : une production autocrine de facteurs de croissance, ou une induction de la production de ces facteurs par le stroma tumoral. En outre, la surexpression des récepteurs aux facteurs de croissance, la mutation et l'activation constitutionnelle de ces récepteurs ainsi que l'activation par mutation ou via la surexpression d'un ou plusieurs acteurs moléculaires des voies de transduction des signaux mitogènes, participent aussi à ce processus.

### I.2.3 Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

L'insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire, comme ceux régulant la transduction du signal au cours de l'activation des voies MAPK, ou le déroulement du cycle cellulaire (p53, p16, inhibiteurs des Cdk<sup>7</sup>), peuvent impliquer soit l'inactivation du récepteur membranaire correspondant, soit un des maillons de la chaîne de transduction de signaux anti-prolifératifs. Dans ce cas on peut citer l'exemple du TGFβ<sup>8</sup>, qui exerce une activité antitumorogénique au niveau des épithéliums via le facteur de

---

<sup>6</sup> ALT : Alternative Lengthening of Telomeres

<sup>7</sup> Cdk : Cycline-dependent kinase

<sup>8</sup> TGFβ : Tumor Growth Factor β

transcription SMAD4. Dans 50 % des cancers du pancréas et dans la majorité des cancers de l'estomac, du sein, de l'ovaire, de la prostate, le gène *smad4* est retrouvé inactivé. L'échappement à la signalisation conduisant à la différenciation cellulaire, est alors une autre stratégie de survie (Ruscetti et al, 2005).

#### I.2.4 Capacité d'induire une néo-angiogenèse

Une des caractéristiques majeure d'une tumeur évolutive, est son besoin accru en oxygène et nutriments (surtout du glucose). Pour gérer cette dépendance, les cellules cancéreuses la formant, doivent posséder la capacité d'induire la formation de nouveaux vaisseaux en modifiant l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. Dans le cas des tumeurs solides, cette néo-angiogenèse aboutit, néanmoins, en la production de vaisseaux imparfaits impliquant une microcirculation incomplète au sein de la tumeur. Ceci a pour conséquence l'apparition de zones nécrotiques et hypoxiques (Shchors et al., 2007).

#### I.2.5 L'échappement à l'apoptose

La cellule possède de nombreux systèmes capables de détecter les anomalies de prolifération cellulaire, les dommages à l'ADN, les anomalies de ségrégation chromosomique. Le cas échéant, la cellule peut déclencher la mort cellulaire, évitant ainsi la prolifération de cellule n'ayant pas hérité intégralement du matériel génétique ou ayant fixé une mutation non réparée. Les cellules tumorales sont, quant à elles, capables d'échapper à cette mort par la sécrétion autocrine de facteur de survie, tels que l'IGF1/2<sup>9</sup>, les interleukines... Plus fréquemment, on observe l'inactivation de gènes activateurs de l'apoptose ou la surexpression d'inhibiteurs physiologiques de l'apoptose comme les membres de la famille Bcl-2.

#### I.2.6 Les capacités d'invasion et de métastase

Les cellules transformées en prolifération accrue sont capables de proliférer à distance. Témoin de la malignité de la tumeur, cette capacité à envahir les tissus voisins ou, via la circulation systémique, des zones à distance, est due à l'expression de protéines particulières comme, par exemple, les métalloprotéases. Celles-ci permettent la dégradation de la matrice extracellulaire et favorisent la migration des cellules tumorales vers les vaisseaux (Golubkov et al., 2006). L'inhibition de protéines impliquées dans les liaisons

---

<sup>9</sup> IGF : Insulin Groxth Factor

entre cellules ou avec la matrice extracellulaire (cadhérines, intégrines...), ainsi que des voies de signalisation intracellulaires les régulant (FAK<sup>10</sup>), favorisent également la dissémination.

### I.2.7 La résistance

Les cellules cancéreuses développent, soit spontanément, soit à la suite de traitement avec des molécules cytotoxiques, des mécanismes de résistance. Parmi ces mécanismes on peut citer l'augmentation de l'activité des processus de détoxification (comme ceux impliquant le glutathion) ou encore des mécanismes de réparation. Néanmoins, un des responsables majeurs de la résistance aux drogues ou MDR<sup>11</sup> est une pompe ATPase membranaire, appelée glycoprotéine-P (Pgp170), et qui est capable d'expulser hors des cellules des composés variés comme les anthracyclines, l'actinomycine D, les vincaalcaloïdes, les épipodophyllotoxines et la colchicine (Teodori et al, 2006). La découverte d'une pompe membranaire active (hydrolysant de l'ATP), et rejetant hors de la cellule de nombreux médicaments hydrophobes de structure et de mécanismes d'action variés est due à l'équipe de V. Ling au Canada (Juliano et al., 1976). Progressivement, d'autres pompes responsables de la résistance pluri-drogues ont été caractérisées et appelées : MRP<sup>12</sup>. Le mécanisme d'action actif de ces pompes se situe au niveau de la membrane plasmique. Les sites de liaison du substrat de ces pompes se situent au niveau de la partie hydrophobe de la protéine, partie enchâssée dans l'épaisseur de la bicouche phospholipidique. Ceci explique pourquoi les cellules résistantes expulsent des composés pourtant capables de se lier avec une haute affinité aux constituants cellulaires, comme l'ADN, puisque ces composés ne rentrent pas dans la cellule mais sont expulsés au niveau de la membrane ou immédiatement pris en charge par l'extrémité cytoplasmique des pompes membranaires.

---

<sup>10</sup> FAK : Focal Adhesion Kinase

<sup>11</sup> MDR : MultiDrug Resistance

<sup>12</sup> MRP : Multi-drug Resistance-associated Protein

## II. La protéine p53 : régulation et fonctions biologiques

La protéine p53 a été pour la première fois décrite en 1979 par l'équipe d'A. Levine, comme liée au processus de transformation cellulaire et associée à l'antigène T du virus simien SV40. Les études initiales portant sur p53 avaient mis en évidence sa probable implication dans la croissance et la prolifération cellulaire. En 1981, une des toutes premières études (Crawford et al., 1981), avait caractérisée la présence d'une surexpression de la protéine p53 dans les tumeurs murines et humaines. La micro-injection d'anticorps anti-p53 inhibait la synthèse d'ADN induite normalement par l'ajout de sérum. Il fut conclut que p53 possédait des propriétés oncogéniques. Le gène *TP53* fut alors initialement considéré comme un proto-oncogène.

Au fur et à mesure de l'avancée des travaux sur de nombreux types cellulaires, des résultats contradictoires (Eliyahu et al., 1989; Lane and Benchimol, 1990) suggéraient que la surexpression de p53 pouvait également réprimer le processus de transformation cancéreuse. Ainsi, près de dix ans après, il fut montré que les propriétés oncogéniques de p53 étaient en fait dues à des mutations. Des études comparatives avec des protéines p53 sauvages ont permis finalement de conclure que le gène codant pour p53 était un gène suppresseur de tumeur.

C'est néanmoins en 1992, que David Lane décrivit dans une expression célèbre, le rôle fondamental de la protéine p53 en la qualifiant de « gardien du génome ». Pendant, les cinq années suivantes, de nombreux travaux contribuèrent à la caractérisation de nouvelles fonctions cellulaires de p53, apparemment indépendantes de ses fonctions « principales de contrôle qualité de l'ADN » et de facteur de transcription. En effet, p53 a été décrite comme une protéine de signalisation intracellulaire, indépendamment de son activité transcriptionnelle, en interagissant avec d'autres protéines cytosoliques (comme HIF-1 $\alpha$ ) régulant ainsi leur stabilité ou encore avec des organites (comme la mitochondrie) via des protéines « BH3 only », comme Bcl-x<sub>L</sub>, déplaçant ainsi leur interaction, par exemple avec Apaf-1, induisant sa libération.

Récemment, p53 via TIGAR<sup>13</sup>, a été caractérisée comme étant impliquée dans le processus de glycolyse et de détoxification des radicaux libres (Corcoran et al., 2006).

---

<sup>13</sup> TIGAR : TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator

Après vingt années d'études intensives et près de 42500 articles scientifiques à ce jour publiés, nous ne savons toujours pas si toutes les fonctions biologiques de p53 ont été caractérisées. Enfin, il a été observé que des souris présentant une délétion de la protéine p21 (protéine régulatrice de cycle cellulaire), ne développent pas de cancers alors que, les même souris invalidées pour le gène p53 en développent très rapidement (Donehower et al., 1992 ; Deng et al., 1995), montre que les mécanismes d'oncogenèse ne sont pas exclusivement dus à des altérations dans les points de contrôle du cycle cellulaire mais que la mort cellulaire est très probablement le mécanisme majeur par lequel p53 inhibe le développement tumoral.

## II.1 Structure et régulation de la protéine p53

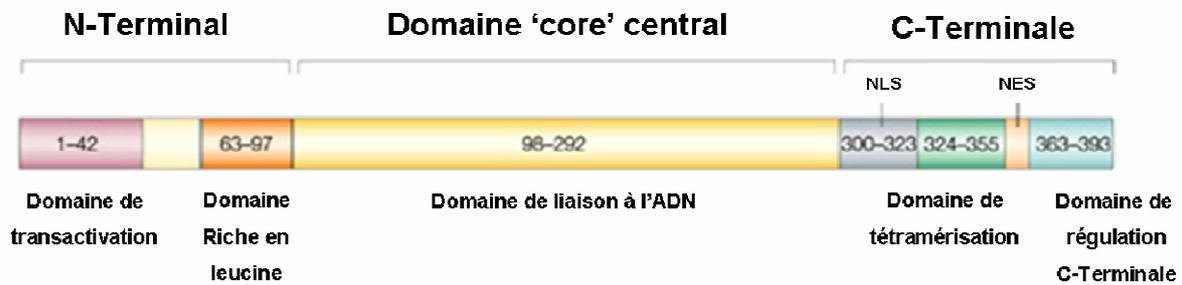
### II.1.1 Structure protéique

Chez l'Homme, p53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés, codée par le gène *TP53* localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13). Elle se compose de trois principaux domaines (Oren M., 1985), structuraux et fonctionnels (**figure 4**). Parmi ces principaux domaines, l'extrémité N-Terminale correspond au domaine transactivateur (résidus 1 à 42), suivi d'une région riche en proline (résidus 63 à 97). Le domaine de transactivation est impliqué dans les interactions protéine-protéine avec des régulateurs tels que MDM2<sup>14</sup>, masquant ainsi les résidus 19 à 26. Cette liaison entraîne son ubiquitinylation puis sa dégradation par le protéasome 26S. D'autres interactions, comme par exemple avec le facteur de transcription p300/CBP régule son activité transcriptionnelle en entraînant son acétylation en C-Terminale. Son domaine central (« core domain », résidus 98 à 292), est responsable de l'interaction spécifique avec l'ADN. p53 se lie spécifiquement à l'ADN double brin, sous forme de tétramère, au niveau de sites consensus contenant deux copies d'une dizaine de paires de bases de séquence pentamérique : 5'-Pu•Pu•Pu•C•(A/T)•(T/A)•G•Py•Py•Py-3' (où Pu = A/G, Py = T/C). C'est souvent au niveau de cette région de liaison à l'ADN que l'on détecte la plupart des mutations retrouvées dans les tumeurs (Bode et al, 2004). C'est à l'extrémité C-Terminale que se situe le domaine de tétramérisation (résidus 324-355) et la région de régulation négative (résidus 363 à 393) contenant les sites de phosphorylations et d'acétylation régulant sa capacité de liaison à l'ADN (Bode et al., 2004). On peut encore signaler la présence entre le domaine central et de tétramérisation, d'une séquence de

---

<sup>14</sup> MDM2 : Murine Double Minute 2 oncogene

localisation nucléaire (résidus 300 à 323) et d'une région riche en leucine (résidus 356 à 362) contenant un signal d'export nucléaire au sein du domaine de tétramérisation.



**Figure 4: Structure et domaines fonctionnels de p53.**

NLS : Signal de localisation nucléaire, NES : Signal d'export nucléaire

(Adapté d'après Bode et al, 2004)

## II.1.2 Régulations de p53

La protéine p53 va subir de nombreuses régulations modifiant sa stabilité et son activité en fonction des stimuli (délétères ou de survie) détectés. Ceci en fait un acteur moléculaire primordial dans l'intégration du signal et la discrimination de la nature de l'agression à laquelle est soumise la cellule.

### II.1.2.1 Régulation « classique » de sa stabilité via HDM2 par ubiquitinylation

L'oncoprotéine MDM2 (HDM2 : homologue chez l'Homme) est connue pour être le régulateur négatif majeur de p53 (Freedman et al., 1999 ; Sionov et al., 1999). Le gène *mdm2* est un gène possédant au sein de sa région promotrice un élément de réponse à p53 (ER : p53 Element Response), sa transcription peut donc être activée par p53 (Lev et al., 2000 ; Lahav et al., 2004). Cette boucle d'autorégulation négative permet de contrôler à tout instant la quantité de p53 présente dans la cellule. MDM2 se lie au niveau de l'extrémité N-Terminale de p53, via une poche hydrophobe complémentaire entre les deux protéines. Au sein de cette zone d'interaction trois acides aminés sont dits essentiels : Phe19, Trp23 et Leu26. Ces résidus sont indispensables à l'activité transactivatrice de p53. En s'y liant MDM2 inhibe cette fonction de p53 en empêchant l'acétylation des résidus et en interférant avec le co-activateur de la transcription p300/CBP.

MDM2 fonctionne comme une enzyme E3 ligase qui ubiquitine p53 (Haupt et al., 1997 ; Yu et al, 2000) et entraîne son exportation du compartiment nucléaire vers le

cytoplasme où elle va être dégradée par le protéasome 26S. Néanmoins, il a été montré que MDM2 catalysait la mono-ubiquitinylation de p53 (Brooks et al., 2004) à de multiples sites, mais en aucun cas ne serait responsable de la poly-ubiquitinylation nécessaire à sa dégradation par le protéasome 26S. Une des hypothèses avancée est que la mono-ubiquitinylation de p53 entraîne un changement de sa conformation, exposant ainsi son signal d'exportation nucléaire permettant que la poly-ubiquitinylation soit cytoplasmique. Ainsi la fonction « E3 ligase » de MDM2 pourrait réguler la fonction transcriptionnelle de p53 en l'exportant du noyau une fois la transcription de gènes cibles effectuées.

L'exportation nucléaire de complexe MDM2-p53 est nécessaire à la dégradation de p53. En effet, l'ajout de leptomycine B (inhibiteur du transport nucléo-cytoplasmique), a pour conséquence une accumulation de p53 dans le noyau sans dégradation (Menéndez et al., 2003). De même, dans certaines cellules cancéreuses (comme les neuroblastomes), p53 peut se trouver séquestrer par différents mécanismes dans le cytoplasme empêchant également sa dégradation (Becker et al., 2007).

#### *II.1.2.2 Les nouvelles hypothèses de la régulation fonctionnelle de p53*

Parmi les travaux sur la stabilisation et la régulation de p53, ceux concernant sa régulation au niveau traductionnel ou transcriptionnel, n'ont été que peu étudiés au profit des études sur les modifications post-traductionnelles, telles que les phosphorylations (discutées plus loin), levant l'interaction avec MDM2. Cette vue a néanmoins été revisitée par une étude (Takagi et al., 2005) mettant en évidence une régulation de p53 au niveau même de sa synthèse, en réponse à des dommages à l'ADN, impliquant une protéine ribosomale L26 et la nucléoline. Cette dernière est une phosphoprotéine nucléolaire impliquée dans la maturation des ARNr et ARNm, dans l'assemblage des ribosomes et le transport nucléocytoplasmique. Ces deux protéines se trouvent présentes dans un complexe nucléoprotéique de machinerie traductionnelle. Lorsque les cellules ne subissent aucun stress, la nucléoline se lie à l'extrémité 5'UTR<sup>15</sup> de l'ARNm de p53 et empêche l'initiation de la traduction. A l'inverse, lorsque les cellules ont subi des dommages à l'ADN, la protéine L26 déplace la nucléoline et active l'initiation de la synthèse protéique.

Une autre nouvelle voie de recherche, situe la régulation de p53 au niveau transcriptionnel (Pekova et al., 2007). En effet, elle implique l'existence de variants d'épissages alternatifs du messenger de p53 (Rohaly et al., 2005), ou d'initiation différentielle

---

<sup>15</sup> UTR : UnTranslated Region

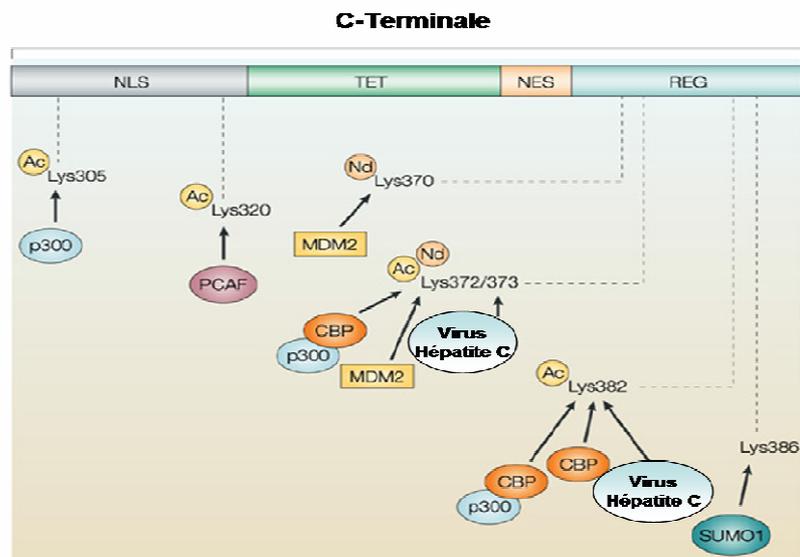
de la transcription au niveau du promoteur. Des études ont caractérisé l'existence d'au moins six isoformes différentes de p53 dans les tissus normaux. Il a été montré que l'isoforme  $\beta$  interagit avec la forme longue de p53 et se fixe ainsi de manière préférentielle au niveau du promoteur des gènes *bax* et *p21* et non à celui de *mdm2* (Bourdon et al., 2005). Dans la même étude, les auteurs montrent qu'une autre isoforme  $\Delta 133p53$ , transcrite à partir du promoteur interne de l'exon 4 du gène *TP53*, agit comme un dominant négatif de l'induction de l'apoptose par p53. Cette expression différentielle des isoformes de p53 dans les tumeurs humaines pourrait, en partie, expliquer la difficulté à lier son statut de cellules cancéreuses et leur sensibilité à certaines drogues.

Enfin, il faut aussi noter l'existence de deux autres membres de la famille p53, qui coopèrent d'un point de vue transcriptionnel avec ce dernier. Il s'agit de p73 et p63 (Müller et al., 2006). Les gènes *TP73* et *TP63*, codent pour une combinaison d'isoformes liée à l'utilisation de deux promoteurs alternatifs, P1 ou P2 et à un épissage alternatif de l'ARNm en 3'. Les isoformes se distinguent en deux groupes, en fonction de la longueur de la séquence N-Terminale. Les isoformes « longues » TAp73 et TAp63 sont sous le contrôle de P1, tandis que les isoformes « courtes »  $\Delta Np73$  et  $\Delta Np63$  sont sous la dépendance de P2 situé dans l'intron 3. En ajoutant la régulation en C-Terminale (due à l'épissage en 3'), il existe de nombreux transcrits et protéines possibles pour chaque gène. Les différentes isoformes ont des effets anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques, en fonction des boucles de régulations transcriptionnelles entre p53 et les isoformes. A titre d'exemple, on peut citer l'activation de la transcription de  $\Delta Np73$  via p53. En retour, celle-ci inhibe la transcription de p53 créant ainsi une boucle de rétrocontrôle réglant la survie et la mort cellulaire. De plus,  $\Delta Np73$  a été décrite, lorsqu'elle est surexprimée, comme un marqueur de mauvais pronostic dans des neuroblastomes de patients (Moll et al., 2004).

### II.1.2.3 Régulation de l'activité de p53 : Acétylations et sumoylations en C-Terminale

La protéine p53 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles en fonction du type de stress appliqué à la cellule et des voies de signalisations impliquées (Bode et al., 2004 ; Olsson et al., 2007). Parmi ces modifications on retrouve, regroupées au niveau C-Terminal : des méthylations, des acétylations via CBP/p300 sur des résidus lysines (Lys370, 372, 373, 381, 382) et par pCAF<sup>16</sup> sur la Lys320 en réponse aux dommages à l'ADN (**figure 5**). Ces acétylations ont pour conséquence la stabilisation de p53 et augmente sa spécificité de liaison aux séquences promotrices.

L'activité de p53 peut également être régulée via l'action de petites molécules de type ubiquitine telles que NEDD8<sup>17</sup> et SUMO-1<sup>18</sup>. Bien que les conséquences fonctionnelles ne sont que très peu connues, il semble que la « neddylation » des Lys370, 372, 373 nécessite la présence de MDM2 et inhibe totalement la capacité de p53 à initier la transcription. SUMO-1, quant à elle, peut être ajoutée au résidu Lys386 provoquant une augmentation de l'activité transactivatrice de p53.



**Figure 5: Acétylations et SUMOylation de p53 à l'extrémité C-Terminale.**

NLS : Signal de localisation nucléaire, NES : Signal d'export nucléaire, TET : Domaine de tétramérisation, REG : Région régulatrice en C-Terminale  
(D'après Bode et al, 2004)

<sup>16</sup> pCAF : p300 and CBP-Associated Factor

<sup>17</sup> NEDD8 : Neural precursor cell expressed Developmentally Downregulated 8

<sup>18</sup> SUMO-1 : Small Ubiquitin-like Modifier-1

Cependant, de manière générale, il est admis que l'activité biologique de p53 est fortement contrôlée par des étapes de phosphorylations/déphosphorylations, ainsi que les interactions protéiques qui en découlent (Bode et al., 2004 ; Olsson et al., 2007). Plus de vingt-trois sites de phosphorylations différents ont été caractérisés, mais leur signification biologique n'est pas encore intégralement connue. La plupart d'entre eux sont regroupés dans les quarante premiers acides aminés de l'extrémité N-Terminale. Nous allons maintenant décrire les principales phosphorylations de p53 et leurs conséquences sur la régulation de son activité.

#### II.1.2.3.1 Phosphorylations de la région N-terminale et rôle dans l'activation de p53

De nombreuses kinases sont connues pour répondre aux stress cellulaires et pour phosphoryler spécifiquement p53 au niveau de résidus particuliers. Parmi elles, les membres de la famille des kinases phosphatidylinositol 3 kinase (PIKK) regroupant, la DNA-PK<sup>19</sup> et l'ATM/ATR<sup>20</sup> qui phosphorylent p53 *in vitro*, en réponse principalement aux dommages à l'ADN. Certaines kinases de la famille des SAK<sup>21</sup>, comme JNK-1 et p38MAPK sont également responsables de modifications post-traductionnelles (**Figure 6**) en N-Terminale (Leblanc et al., 2002).

La sérine 15 peut être phosphorylée par deux kinases, la DNA-PK (une sérine/thréonine kinase) et ATM/ATR. Cette phosphorylation stimule ainsi l'interaction de p53 avec ses co-activateurs transcriptionnels, les histones acétyltransférases p300/CBP. De plus, en réponse aux dommages à l'ADN, la sérine 20 est phosphorylée *in vitro* par Chk1 et Chk2 (Check point kinase), activées par ATM/ATR. Ceci augmente la transactivation du gène *p21* (impliqué dans l'arrêt un du cycle cellulaire) et *mdm2*. En plus de participer à la stabilisation de p53, la phosphorylation des résidus 15 et 20 permet la séquestration de p53 dans le noyau (Olsson et al., 2007). Toutefois, de nombreux travaux font état de la présence de la forme phosphorylée de p53Ser15 à la mitochondrie. La phosphorylation sur ce résidu permet aussi un réarrangement conformationnel de la protéine, rendant le domaine de tétramérisation accessible.

p38MAPK1, quant à elle, ajoute un groupement phosphate sur le résidu 46. Ceci favorise l'initiation de la transcription du gène pro-apoptotique *p53AIP-1* ou « p53-regulated

---

<sup>19</sup> DNA-PK : DNA-activated Protein Kinase

<sup>20</sup> ATM/ATR : Ataxia-Telangiectasia mutated/ATM- and Rad3-related kinases

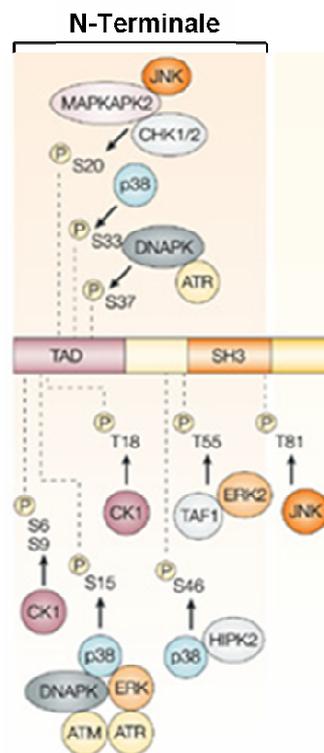
<sup>21</sup> SAK : Stress-Activated Kinase

Apoptosis-Inducing Factor 1 ». Cela entraîne au niveau de la mitochondrie une dissipation du potentiel transmembranaire et l'induction de la mort cellulaire programmée.

La protéine JNK1, lors d'un stress UV et/ou dommage à l'ADN phosphoryle p53 sur les sérines 33 et 37 et la thréonine 81. Ceci stabilise p53 et augmente son activité transcriptionnelle. Les sérines 33 et 37 sont également les substrats de JNK1 spécifiquement lors de l'application d'un stress UV. D'autre part, la fixation de JNK1 à p53 au niveau N-Terminal entraîne la polyubiquitinylation de p53 et sa dégradation.

La sérine 33 est le substrat de la CAK<sup>22</sup>. De même, les résidus 6 et 9 et 18 de p53 peuvent être phosphorylés par la CK1<sup>23</sup> ayant pour effet, de stabiliser fortement le complexe p53/p300/CBP.

En résumé, les phosphorylations concernant l'extrémité N-Terminale de p53 ont pour but de stabiliser la protéine, consolider les interactions protéines/protéines et d'augmenter ses propriétés de transactivation.



**Figure 6: Phosphorylations de l'extrémité N-Terminale de p53 par de nombreuses kinases.**

TAD : Domaine de transactivation, SH3 : Domaine riche en proline

(Adapté d'après Bode et al, 2004)

<sup>22</sup> CAK : Cycline dependent kinase Activating Kinase

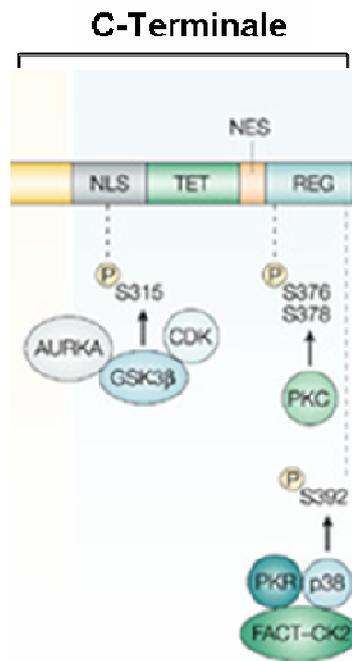
<sup>23</sup> CK1 : Caséine Kinase 1

### II.1.2.3.2 Phosphorylations de la région C-terminale et rôle dans l'activation de p53

Le domaine C-Terminal de p53 (**Figure 7**) est, quant à lui, phosphorylé par des kinases dépendantes des cyclines, comme Cdk2, mais aussi par la PKC (Protéine Kinase C), la CKII (Caséine Kinase II) ou encore la PKR (double-stranded-RNA-activated Protein Kinase). Le résidu sérine 315 est une cible de p34<sup>cdc2</sup> et de Cdk2. *In vivo*, cette phosphorylation augmente de manière significative la fixation de p53 à l'ADN, et stimule son activité transcriptionnelle. Les résidus 376 et 378 sont des sites de phosphorylation de la PKC, qui sont constitutivement phosphorylés dans les cellules non stressées et permettrait une augmentation de la polyubiquitinylation et la dégradation de p53.

Les phosphorylations des sérines 315, 378, 392 augmentent la force de l'interaction p53/ADN. La sérine 392 revêt une importance toute particulière, puisque sa phosphorylation unique par la CK2 ou PKR suite à une irradiation UV, provoque une tétramérisation, une activation et une fixation accrue de p53 à l'ADN.

Il apparaît que les différentes phosphorylations de l'extrémité carboxy-terminale favoriseraient de façon déterminante la fixation spécifique de p53 à l'ADN.



**Figure 7: Phosphorylations de l'extrémité C-Terminal de p53 par de nombreuses kinases.**

NLS : Signal de localisation nucléaire, TET : Domaine de tétramérisation, NES : Signal d'export nucléaire,  
REG : Région régulatrice en C-Terminal.

(Adapté d'après Bode et al, 2004)

## II.2 Fonctions biologiques de p53

Nous venons de voir les différents mécanismes conduisant à la stabilisation et à l'activation de p53 suite à un stress cellulaire. Une fois fonctionnelle, la protéine p53 va pouvoir réguler de nombreux processus cellulaires (Levine et al., 2006). Ceci permettra à la cellule d'élaborer une réponse adaptée au stress appliqué, de réparer les dommages induits et éventuellement d'induire la mort cellulaire (apoptotique ou autophagique) si la cellule ne peut retrouver une physiologie normale. (Figure 8).

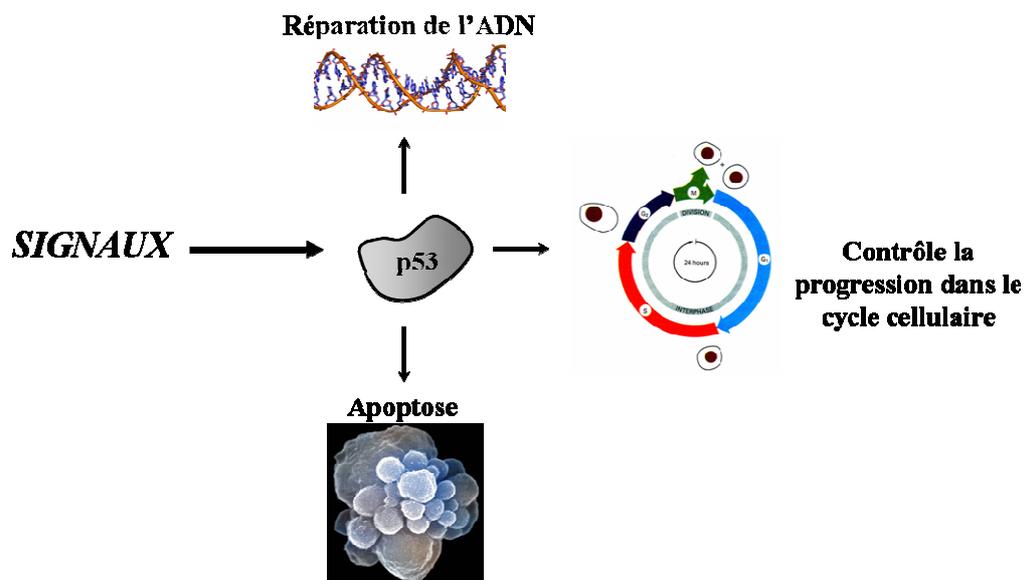


Figure 8 : Principales implications fonctionnelles de p53.

### II.2.1 L'arrêt du cycle cellulaire

Lorsqu'une cellule est soumise à un stress, elle doit pouvoir élaborer des stratégies d'adaptations et de réparations. A cet effet, p53 va induire un arrêt de la prolifération (El Deiry et al., 1998 ; Sionov et al., 1999), en agissant au niveau des points de contrôle des phases G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub> du cycle cellulaire (figure 9). L'arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub> est du entre autre, à l'induction via, p53 de p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. Cette dernière inhibe les protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK4 et CDK2) phosphorylant notamment la protéine du rétinoblastome (pRb). Dans sa forme hypophosphorylée, pRb séquestre le facteur de transcription E2F, empêchant la transition de la phase G<sub>1</sub> à S. En outre, en recrutant des histones désacétylases (HDAC), pRb entraîne la compaction de la chromatine, rendant toute nouvelle transcription impossible. Ainsi, les gènes impliqués dans la transition G<sub>1</sub> à S deviennent inaccessibles à la machinerie transcriptionnelle. En parallèle, p21 va également

bloquer la réplication de l'ADN en inhibant l'activation de l'ADN polymérase  $\delta$  par le PCNA<sup>24</sup> (Waga et al., 1997). Par ailleurs, p53 peut aussi provoquer l'arrêt en G1, en interagissant directement avec la cycline H, inhibant ainsi la formation du complexe CDK7/CyclineH1/p36 activant normalement le complexe CDK2/Cycline E requis pour le passage de G1 en S.

Outre l'arrêt du cycle en G1, p53 va également agir au point de contrôle G2/M (Peng et al., 1997). En effet, en activant la transcription du gène *14-3-3 $\sigma$* , p53 va favoriser la séquestration sous sa forme phosphorylée de cdc25C. Celle-ci, sous forme non phosphorylée, déphosphoryle CDK1, activant ainsi le complexe CDK1-cycline B en MPF<sup>25</sup>, est essentiel pour le passage G2/M (Boutros et al., 2007). L'inhibition de ce complexe sera également due à l'induction du gène *gadd45*<sup>26</sup>, via probablement une interaction directe entre la protéine GADD45 et CDK1. Il semblerait également que p53 soit impliqué dans un point de contrôle au cours de la mitose, durant de la formation des pôles du fuseau mitotique, afin d'éviter la naissance de cellule polyploïdes (Borel et al., 2002).

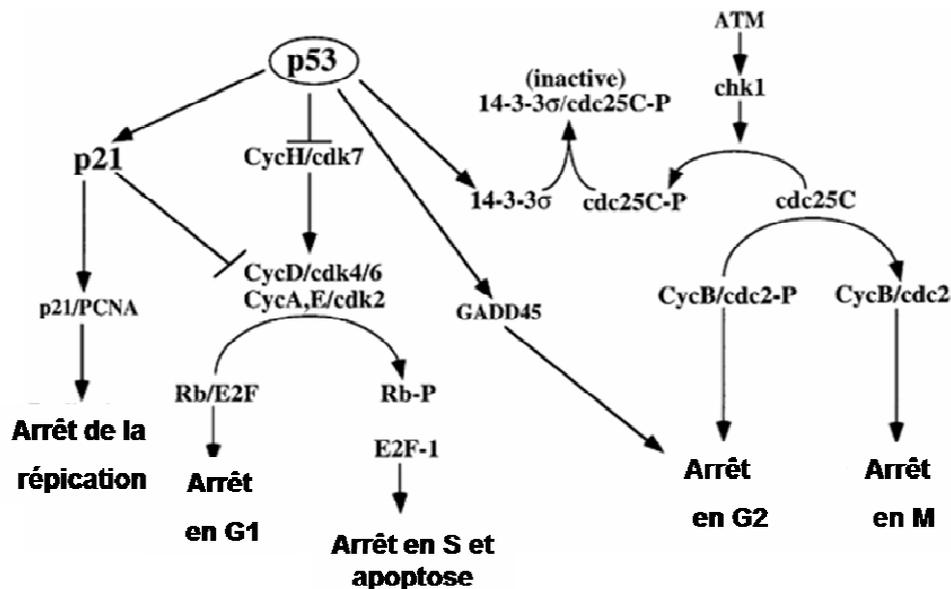


Figure 9 : Contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire par p53. (D'après Sionov et al, 1999)

En complément du contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire, p53 va activer, via GADD45, les mécanismes de réparations de l'ADN. p53 va induire la réparation par « excision de

<sup>24</sup> PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

<sup>25</sup> MPF : Maturation Promoting Factor

<sup>26</sup> GADD45 : Growth Arrest and DNA Damage-inductible gene

nucléotides » via PCNA qui interagit directement avec les ADN polymérase. De plus, GADD45 pourrait également servir à reconnaître l'état altéré de la chromatine et moduler l'accessibilité à l'ADN de facteurs de transcription.

Enfin, p53 est très largement impliquée dans l'élaboration et la modulation de la réponse apoptotique. Ce rôle sera plus amplement détaillé dans les paragraphes suivants dans la **partie II**.

## II.2.2 p53 et son rôle dans le métabolisme cellulaire

Des travaux de plus en plus nombreux suggèrent que la protéine p53 n'interviendrait pas uniquement dans la réponse aux stress mais aussi au sein d'autres signalisations impliquées dans la physiologie cellulaire. Parmi les signalisations où p53 serait impliquée, on peut citer son rôle dans la régulation du métabolisme énergétique.

### *II.2.2.1 Le suppresseur de tumeur p53 et le métabolisme énergétique*

La prolifération cellulaire est dépendante de la production d'énergie et par conséquent du métabolisme glucidique. L'AMPK<sup>27</sup> est directement impliquée dans le métabolisme du glucose, en servant de « détecteur métabolique » de la cellule (Andreelli et al., 2003). L'AMPK est activée physiologiquement par l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMP lors de situation de carence énergétique cellulaire (hypoxie, hypoglycémie, exercice physique). En outre, il a été montré qu'elle phosphoryle spécifiquement p53 (Thoreen et al., 2005). Ainsi, au cours des carences transitoires en glucose, cette phosphorylation de p53 induit un arrêt du cycle cellulaire, réversible dans les cellules « normales » (Jones et al., 2005). Ceci pourrait expliquer la capacité des cellules transformées et mutées pour le gène *TP53*, de continuer à proliférer, même lorsque la disponibilité de nutriment au sein de la tumeur diminue.

Ces découvertes récentes sont importantes dans le contexte du métabolisme de cellules cancéreuses. En effet, la grande majorité des cellules tumorales présentent une modification de leur métabolisme énergétique. Celui-ci est caractérisé par le passage d'un métabolisme énergétique mitochondrial (phosphorylation oxydative) vers une utilisation exacerbée de la glycolyse pour la production d'énergie, même en présence d'oxygène. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Warburg (Warburg et al., 1930). Il peut s'expliquer

---

<sup>27</sup> AMPK : Adénosine Monophosphate Kinase

par le fait que p53, via l'expression de *SCO2*<sup>28</sup>, peut moduler le passage entre un métabolisme aérobie et la glycolyse<sup>29</sup> (Matoba et al., 2006). En effet, *SCO2* participe à la mise en place du complexe cytochrome *c* oxydase (COX, complexe II) de la chaîne de phosphorylation oxydative, essentielle à la production d'ATP. Par conséquent, des cellules cancéreuses possédant une protéine p53 mutée non fonctionnelle et présentant une chaîne respiratoire mitochondriale défectueuse, vont effectuer un passage vers un métabolisme exclusivement glycolytique (**figure 10**). De ce fait, les cellules cancéreuses devront augmenter leur absorption en glucose (notamment en augmentant le nombre de transporteurs membranaires du glucose) et sa dégradation en acide lactique. Au cours de la croissance tumorale, les cellules, se trouvant à distance des vaisseaux sanguins, ont un apport en oxygène limité. Le basculement vers le métabolisme glycolytique pourrait leur apporter un avantage de croissance, bien avant l'induction de l'angiogénèse.

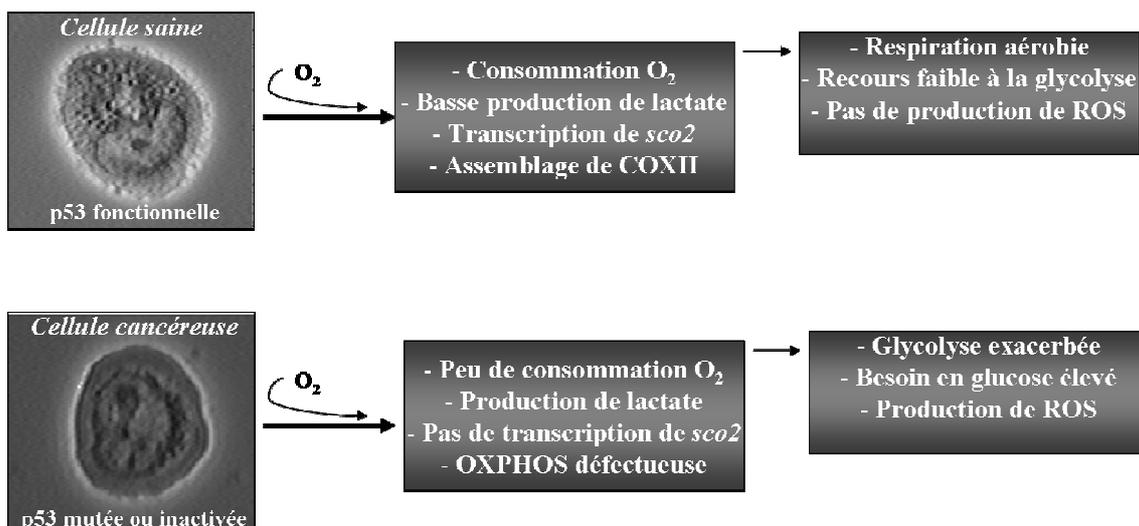


Figure 10 : Métabolisme énergétique préférentiel des cellules cancéreuses.

TIGAR<sup>30</sup> est un autre régulateur métabolique dont l'expression du gène est sous la dépendance de p53. Cette protéine oriente le métabolisme énergétique vers la voie des pentoses phosphates, ayant pour effet la production de molécules de NADPH. Ceux-ci sont absolument essentiels à la détoxification des ROS<sup>31</sup> par le glutathion. Ainsi on peut aisément

<sup>28</sup> *SCO2* : Synthesis of Cytochrome *c* Oxidase 2

<sup>29</sup> Appelée également abusivement « **glycolyse aérobie** » car elle persiste durablement et est exacerbée dans les cellules cancéreuses même en présence d'une concentration en oxygène normale (normoxie).

<sup>30</sup> TIGAR : *TP53*-induced glycolysis and Apoptosis Regulator

<sup>31</sup> ROS : Reactive Oxygen Species<

comprendre que, via TIGAR, p53 va pouvoir moduler le seuil de sensibilité des cellules à des stress oxydatifs transitoires (Bensaad et al., 2006).

#### *II.2.2.2 Implication de p53 dans la différenciation cellulaire*

Outre ses fonctions de protéine intégratrice des signaux de stress, p53 semble également impliqué dans le processus de différenciation cellulaire. Pour se différencier, une cellule souche doit perdre sa capacité d'auto-renouvellement et de prolifération. Une étude portant sur des cellules souches embryonnaires de souris (Lin et al., 2005) a montré que p53 pouvait se fixer sur le promoteur du gène *Nanog* et inhiber son expression. Ce gène étant responsable de l'auto-renouvellement des cellules souches, son extinction par p53 entraîne la cellule dans la voie de la différenciation. Une étude récente a mis en évidence dans des cellules embryonnaires humaines, que l'expression de p53 était directement corrélée, d'une part à l'apoptose spontanée de ce type de cellule, et significativement, au pourcentage de cellules en différenciation (Qin et al., 2007).

### **II.3 p53 et cancers**

La protéine p53 est retrouvée mutée dans plus de 60 % des cancers. Ces mutations d'étiologie et de nature variée comme nous l'avons vu plus haut, affectent des domaines variables de p53. L'inactivation de p53 peut aussi être due à sa liaison avec certaines protéines virales telles que la protéine E6 du papillomavirus humain à l'origine des cancers du col de l'utérus (Scheffner M., 1998). C'est également la voie de signalisation de p53 qui peut être perturbée par altération de l'expression du gène *mdm2*, qui est surexprimé ou éteint. Nous allons maintenant examiner les mutations les plus fréquentes qui sont responsables de l'inactivation de p53, ainsi que leurs conséquences sur sa phosphorylation et sur son activité biologique. De façon générale, la domaine de liaison à l'ADN (**figure 11**) est le site le plus couramment muté de la protéine p53 (Bode et al., 2004), suivi par le domaine de tétramérisation (3,2%), le domaine riche en proline, le domaine de transactivation (1,7%) et le domaine de régulation en C-Terminale.

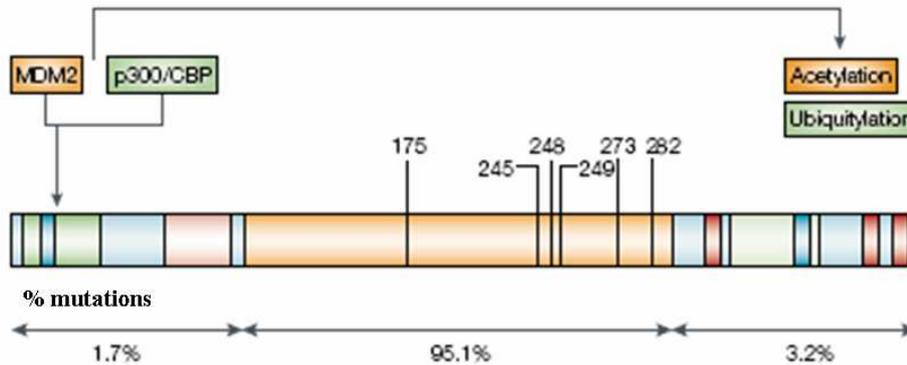


Figure 11 : Sites de mutations fréquents de la protéine p53

(D'après Vousden et al., 2002)

### II.3.1. Les mutations et les mutants de p53

Les mutations ponctuelles faux-sens sont très souvent à l'origine de l'inactivation de p53 (73% des mutations). Statistiquement, elles concernent plus particulièrement des codons clés (« hot-spot »), tels que 175, 248, 273. Ils sont considérés comme ceux les plus fréquemment mutés (Dridi et al, 2006), et sont en cause dans l'émergence de nombreux cancers. Il faut préciser que les protéines p53 mutées résultantes, présentent très souvent une activité dominante négative.

Le mutant p53-**273His** est le plus fréquemment retrouvé. Sa conformation spatiale reste native. Cependant, malgré une activité transcriptionnelle résiduelle lui permettant de transcrire *p21*, elle est incapable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub> tétraploïde, lors d'une agression par des radiations ionisantes. Toutefois, elle assure ce point de contrôle, lorsque le stimulus appliqué est une drogue de type inhibiteur de formation du fuseau mitotique. Ainsi, les formes p53 sauvages ou mutés peuvent garder leur capacité, par des modifications post-traductionnelles, de discrimination de la nature du stress cellulaire.

Le mutant p53-**Arg273Leu**, maintient également une conformation spatiale native mais est incapable d'induire la transcription.

Le mutant p53-**Arg175His** adopte une conformation spatiale mutante, empêchant toute interaction avec l'ADN.

Le mutant p53-**Arg248Trp** ne peut se lier aux régions promotrices malgré le maintien de sa conformation spatiale native

Enfin, le mutant p53-**Val143Ala**, est capable d'entraîner un arrêt au stade G<sub>1</sub> tétraploïde consécutivement à un traitement aux radiations ionisantes mais pas après un traitement par les inhibiteurs de formation du fuseau mitotique.

Les différentes caractéristiques biologiques et fonctionnelles de ces principaux mutants sont résumées dans le **tableau 2**.

Mutants	Conformation spatiale	Capacité de se lier à une sous-unité sauvage de p53	Domaine de liaison à l'ADN	Activité transcriptionnelle
p53 <sup>273His</sup>	Native	Oui	Actif	Oui
p53 <sup>273Leu</sup>	Native	Oui	Actif	Non
p53 <sup>175His</sup>	Mutante	Oui	Inactif	Non
p53 <sup>248Trp</sup>	Native	Oui	Inactif	Non
p53 <sup>143Ala</sup>	Mutante	Oui	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>

**Tableau 2 : Principales conséquences biologiques des mutations les plus fréquentes de p53.**

*n.d* : non déterminé (Adapté de de Dridi et al., 2006)

Nous avons vu, plus haut, l'importance des phosphorylations de résidus spécifiques dans l'établissement de la stabilisation de p53 et l'initiation de ses fonctions biologiques. Il est donc intéressant de décrire les états de phosphorylation de p53 dans les cellules cancéreuses humaines.

### II.3.2 Les phosphorylations des mutants de p53

La description systématique des schémas de phosphorylation des protéines p53 mutantes pourrait probablement aider à la compréhension de la plus grande stabilité des protéines p53 mutées au sein des tumeurs (Buschmann et al., 2000). Il est curieux que les protéines p53 ayant maintenu un phénotype sauvage dans les cellules cancéreuses, y présentent un capacité transcriptionnelle moindre par rapport à leur homologue dans les tissus sains (Bullock et al., 1997 et Satyamoorthy et al., 2000). De façon générale, il a été trouvé dans les tissus cancéreux un degré de phosphorylation de p53 nettement supérieur à celui détecté dans les tissus normaux, Cette augmentation est indépendante du statut mutationnel de p53 dans les tumeurs (muté ou sauvage). Parmi ces phosphorylations, les résidus les plus phosphorylés sont la Ser15, la Thr81, la Ser392 et le site d'acétylation au niveau des acides

aminés 320, 373, 382. Ceci revêt une importance particulière, puisque la Sérine 15 est un résidu dont la phosphorylation est préalable à l'interaction avec d'autres kinases, phosphorylant alors d'autres résidus. La thréonine 81, quant à elle, est directement liée à l'activation transcriptionnelle de p53.

Une étude systématique (Minamoto et al., 2001) a mis en évidence que le schéma de phosphorylations de cellules cancéreuses ne reflète pas la nature du type de tumeur, ni une mutation particulière. Cependant, l'analyse de résidus clés dans la fonctionnalité de p53 (Ser15 et Thr81) était en corrélation avec le statut muté ou sauvage de p53. Par exemple, 100 % des tumeurs portant une mutation sur p53 étaient hyperphosphorylées sur la Ser15, et la Thr81, et hyperacétylées sur le résidu 392. Un grand nombre de tumeurs présentent une hyperphosphorylation de la Thr81 (environ 83%) et de la serine 15 (environ 72%). En outre, les phosphorylations de p53 sont séquentielles, ainsi l'absence de détection de phosphorylation sur la Ser15 au moment de l'analyse, ne signifie pas qu'elle n'a pas été préalablement soumise à une phosphorylation.

### II.3.3 Le cas particulier de p53 dans les neuroblastomes

Le neuroblastome fait partie des cancers malins les plus abondant chez le jeune enfant, et est toujours toujours particulièrement difficile à traiter. Malgré un traitement combinant chimiothérapie et radiothérapie, on ne peut se prévaloir que d'une survie d'environ 40 % à long terme (Maris et al., 2007).

Une des caractéristiques moléculaires majeures de ces cancers est que la protéine p53 n'est que rarement mutée, c'est-à-dire dans 1 à 2 % des cas (Tweddle et al., 2003). Ceci est d'autant plus intrigant qu'environ 60 % des cancers en possède. Des mutations de p53 apparaissent dans les neuroblastomes mais après traitements chimiothérapeutiques ou radiothérapiques. Néanmoins, les résultats expérimentaux tendent à montrer que la dynamique (expression, phosphorylation, localisation intracellulaire) de la protéine p53 est tout de même affectée. De ce fait, une autre voie d'inactivation est très probablement impliquée.

En effet, la séquestration cytoplasmique de p53 a été avancée comme un des mécanismes potentiels d'inactivation de p53 dans ces cancers. A l'origine de cette séquestration on retrouve le masquage de l'extrémité C-Terminale, la résistance à la dégradation via MDM2 ou encore l'interaction avec les récepteurs aux glucocorticoïdes (Ostermeyer et al., 1996 et Tweddle et al., 2003). Récemment, une étude a démontré que l'inactivation de p53 dans les neuroblastomes était due à une hyperubiquitinylation (Becker et

al., 2007), et ceci empêchait sa relocalisation nucléaire. La levée de cette ubiquitinylation par la protéine HAUSP<sup>32</sup> induit une stabilisation de p53, un arrêt du cycle cellulaire et l'initiation d'une signalisation de mort.

Dans tout les cas l'abolissement des fonctions de p53 dans les neuroblastomes peut être interprété comme une défaillance des mécanismes assurant sa translocation nucléaire.

En outre, comme de nombreuses tumeurs solides, le neuroblastome développe au fur et à mesure de la croissance tumorale des zones hypoxiques. Celles-ci évolueront, soit vers une mort de type nécrotique, soit vers une signalisation de mort de type apoptotique ou encore vers une adaptation cellulaire en se différenciant, ou en favorisant un métabolisme glycolytique, et une résistance aux drogues accrues.

---

<sup>32</sup> HAUSP : Herpes virus-Associated Ubiquitin-Specific Protease

## PARTIE II : Apoptose et mécanismes de régulation

A partir de la fin des années 1970 et notamment à la suite des travaux de l'équipe d'Horvitz H. R., le concept de mort cellulaire et de son contrôle est devenu central dans la physiopathologie du cancer. Néanmoins, le cancer au niveau cellulaire, pourrait ne pas être défini de manière négative, mais plutôt présenté comme un excès de vie corrélé avec un défaut de la réponse à l'induction de mort. Avant de décrire et de discuter les principaux acteurs et les voies de mort cellulaire, il convient de faire un bref rappel de l'histoire de la recherche sur la mort cellulaire contrôlée.

C'est en 1972, qu'a été proposé le terme d' « apoptose » par Kerr, Wyllie et Curie. En grec ce terme signifie « chute des feuilles » lorsque l'automne arrive. Ainsi, les auteurs décrivent ce type de mort cellulaire différent de la nécrose, seule forme de mort caractérisée jusqu'alors. Dans les années 1980, Wyllie a proposé que la condensation de la chromatine, observée lors du processus d'apoptose, avait une signification biochimique. En effet, elle était suivie d'une fragmentation, qui n'était pas aléatoire, mais régulière donnant naissance à des fragments d'ADN de 200 bp ou ses multiples. Malgré ces découvertes intéressantes sur un nouveau mécanisme de mort, l'apoptose ne fut que très peu étudiée.

Il a fallu attendre que la communauté scientifique se rende compte que ce processus de mort cellulaire était actif et génétiquement contrôlé, pour que de nombreuses recherches soient entreprises. Ce sont les travaux de Horvitz et de son équipe, sur l'embryogenèse d'un nématode, *Caenorhabditis elegans*, qui ont mis en évidence la particularité qu'au cours de son développement, ce vers subissait la mort d'un nombre toujours identique de cellules et que celles-ci étaient toujours les mêmes. Au fur et à mesure des avancées scientifiques, une série de gènes contrôlant l'ensemble des étapes de la mort de *C. elegans* fut caractérisée. L'ensemble de ces travaux ont permis de décrire 14 gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée chez *C. elegans* au cours de son développement, et un gène impliqué dans son inhibition. Parmi eux, les gènes *egl-1*<sup>33</sup>, *ced-3*, *ced-4*<sup>34</sup> ont été décrits comme étant pro-apoptotique alors que *ced-9* était anti-apoptotique. Très rapidement des gènes orthologues (**figure 12**) ont été recherchés au cours de l'embryogenèse humaine. C'est en 1984 qu'on a découvert, à partir d'un point de cassure de la translocation t(14,18) (dans les lymphomes de

---

<sup>33</sup> EGL : *C. elegans* Egg Laying defective

<sup>34</sup> CED : *C. elegans* Cell Death genes

type 2 de cellules B humaine), le gène *bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*). Cette découverte fut le point de départ de nombreux travaux sur la mort cellulaire. En effet, une fois transfecté dans des cellules hématopoïétiques, ce gène prolonge de manière significative la durée de vie des cellules, non pas en favorisant la prolifération, mais en bloquant la mort cellulaire. A partir de 1990, le nombre de travaux sur l'apoptose ont augmenté de façon exponentielle avec la parution chaque mois de centaines de publications sur le sujet.

Enfin, la reconnaissance du rôle primordial de la mort cellulaire « programmée » et des éléments qui la contrôle, en physiologie et en médecine, a été apportée en décembre 2002, par l'obtention du prix Nobel de médecine par Brenner, Sulston et Horvitz.

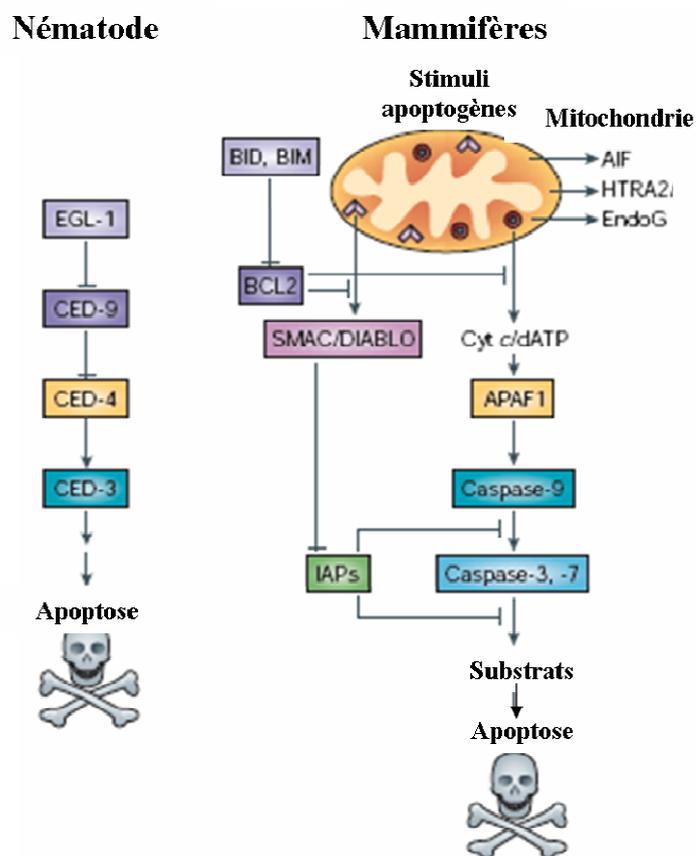


Figure 12 : Les gènes impliqués dans l'apoptose chez *C. elegans* et leurs orthologues chez les mammifères. (Adapté d'après Riedl et al., 2004)

Aujourd'hui, des résultats récents invitent à envisager de nouveaux mécanismes de mort. En effet, la nécrose semble également contrôlée, souvent par des acteurs impliqués dans les processus d'apoptose (comme les caspases). Elle pourrait, en outre, être impliquée au cours du développement dans la formation des sillons interdigitaux (Chautan et al., 1999). De

plus, l'autophagie, mécanisme de survie des cellules eucaryotes (notamment en période de déprivation), peut aboutir à un processus de mort à part entière, bien que la signalisation impliquée n'a pas encore été clairement définie (Ganzalez-Polo et al, 2005).

L'apoptose nous a-t-elle livré tout ses secrets ? En attendant, la réponse de trouve peut-être dans la compréhension des mécanismes de mort alternatifs.

Actuellement, on dénombre au moins onze types de mort cellulaire clairement caractérisées, comprenant en plus de la nécrose, de l'apoptose et de l'autophagie, des processus possédant des signalisations qui leurs sont propres tels que, l'anoïkis, l'excitotoxicité, la cornification des kératinocytes (**tableau 3**)... (Melino et al., 2005).

<b>Caractéristiques morphologiques et biochimiques</b>	<b>Nécrose</b>	<b>Apoptose</b>	<b>Anoïkis<sup>35</sup></b>	<b>Apoptose indépendante des caspases</b>	<b>Autophagie</b>	<b>Cornification des kératinocytes</b>
<i>Régulation moléculaire</i>	non	oui	oui	oui	oui	oui
<i>Exposition des résidus phosphatidyl-serine</i>	-	+	+	+	+	<i>nd</i>
<i>Réarrangement des lipides</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Perte de l'intégrité membranaire</i>	lysée	intacte	intacte	intacte	intacte	Intacte mais liaison covalente entre phospholipides
<i>Stress du réticulum endoplasmique</i>		+/-		+/-	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
<i>Collapse du potentiel membranaire mitochondrial</i>	+/-	+++	+	+	+	<i>n.d</i>
<i>Perte de l'intégrité mitochondriale</i>	+/-	++	++	++	-	<i>n.d</i>
<i>Perte de l'intégrité nucléaire</i>	+	-	-	-	-	+
<i>Condensation de la chromatine</i>	+/-	+++ et marginalisation	++	++	-	<i>n.d</i>
<i>Fragmentation de l'ADN</i>	-	+++	+++	+++	-	<i>n.d</i>
<i>Formation du DISC</i>	-	+/-	-	<i>n.d</i>	-	-

**Tableau 3 : Principaux évènements associés aux types de mort cellulaire les plus courantes.**

*n.d* : non déterminé (D'après Melino et al., 2005)

<sup>35</sup> Anoïkis : terme grec signifiant « sans domicile » : définit une apoptose par perte de l'adhérence cellulaire.

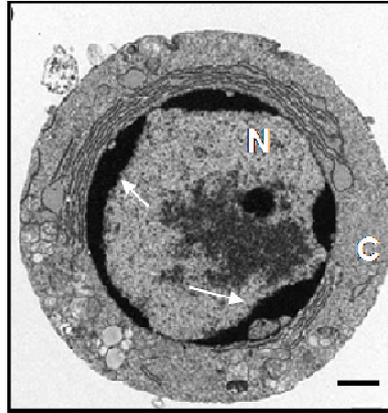
# I. Caractéristiques principales de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie

## I.1 L'apoptose

L'apoptose (ou « mort de classe I ») possède une caractéristique fondamentale par rapport aux autres types de mort, c'est la transformation ultime de la cellule en corps apoptotiques ou structures mini cellulaires. Celles-ci contiennent des organites, des fragments de noyaux et de cytosol entourés d'une membrane plasmique leur conférant une perméabilité intacte. Ces changements n'entraînent pas *in vivo* le déclenchement d'une réponse immunitaire inflammatoire. Ceci implique une suite d'évènements communs aux différents types de mort cellulaires décrites (**tableau 3**). Elles comprennent notamment, la condensation de la chromatine, la ségrégation périphérique de la chromatine au niveau de l'enveloppe nucléaire et la fragmentation de l'ADN en séquences oligonucléosomiques (Susin et al., 2000 ; Melino et al., 2005). En parallèle de ces modifications nucléaires, le compartiment cytoplasmique subit lui aussi de profondes altérations (**figure 13**). Il s'agit d'une condensation, d'une perte d'eau, avec inversement du rapport nucléocytoplasmique, apparition des premières vacuoles, aboutissant aux futurs corps apoptotiques. La cellule s'arrondie de plus en plus et les organites, tels que les mitochondries, commencent à se dilater, mais restent intacts. L'intégralité de la membrane plasmique est conservée, les résidus phosphatidylsérines localisés du côté cytoplasmique subissent un mouvement membranaire ('flip-flop') les exposant au niveau du feuillet extérieur de la membrane, tandis que la sphingomyéline effectue un mouvement inverse. La dégradation de cette dernière en céramides, permet d'amplifier le signal de mort. Ces évènements participent à la reconnaissance par les macrophages des cellules apoptotiques (Galluzzi et al, 2007).

D'un point de vue intracellulaire, le pH devient relativement acide, le collapse du potentiel membranaire mitochondrial entraîne la libération dans le cytoplasme de petites molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, Smac/Diablo, AIF...). Ces relargages entraînent l'activation de protéases spécifiques (les caspases), qui vont soit cliver (et donc activer) d'autres caspases, ou des substrats cellulaires aboutissant dans les deux cas à la mort cellulaire.

Ainsi, l'apoptose se présente comme un processus actif, nécessitant la synthèse de protéines *de novo*, l'activation de protéases spécifiques, l'inhibition de protéines anti-apoptotiques, le recrutement de nombreuses molécules de signalisation.



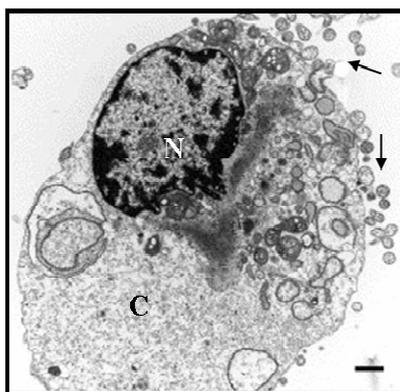
**Figure 13: Observation en microscopie électronique d'une cellule en apoptose.**

N : Noyau ; C : compartiment cytoplasmique. On peut observer la condensation de la chromatine en « roue de charrette » (flèches) et la diminution du volume du cytoplasme. L'échelle représente 1 µm.

(D'après Edinger et al, 2004)

## I.2 La nécrose

La nécrose, « dégénération du corps » en grec, est un type de mort cellulaire habituellement décrit de manière négative. En effet, lorsque la mort cellulaire observée ne présente pas les caractéristiques morphologiques ou biochimiques de l'apoptose, elle est qualifiée de mort par nécrose, par défaut. Cependant, certains travaux récents, suggéreraient que la nécrose serait un processus de mort contrôlé à part entière (Degterev et al, 2005), partageant même avec l'apoptose des voies de signalisations communes. Cette voie serait alors nommée « nécroptose », en référence au terme d'apoptose, mais il n'existe pas de consensus scientifique à ce jour. Il convient de décrire la nécrose comme une mort induite par un stress cellulaire important ou soutenu. Elle conduit *in vivo* à une réaction inflammatoire provoquée par la libération, dans le milieu extracellulaire, du contenu cytoplasmique, elle est ainsi qualifiée de « mort bruyante ». Les changements structuraux majeurs y étant classiquement associés sont une condensation modérée de la chromatine mais sans redistribution marginale et une rupture de la membrane nucléaire. Il se produit aussi un gonflement des organites, ainsi que de leur désagrégation, une augmentation de volume du cytoplasme et la rupture de la membrane plasmique (**figure 14**).



**Figure 14 : Photographie de microscopie électronique d'une cellule en nécrose.**

N : Noyau ; C : compartiment cytoplasmique. La cellule est totalement lysée et le contenu cytoplasmique libéré dans le milieu extracellulaire (flèches). L'échelle est de 1µm.

(D'après Vitale et al, 1998)

### I.3 L'autophagie

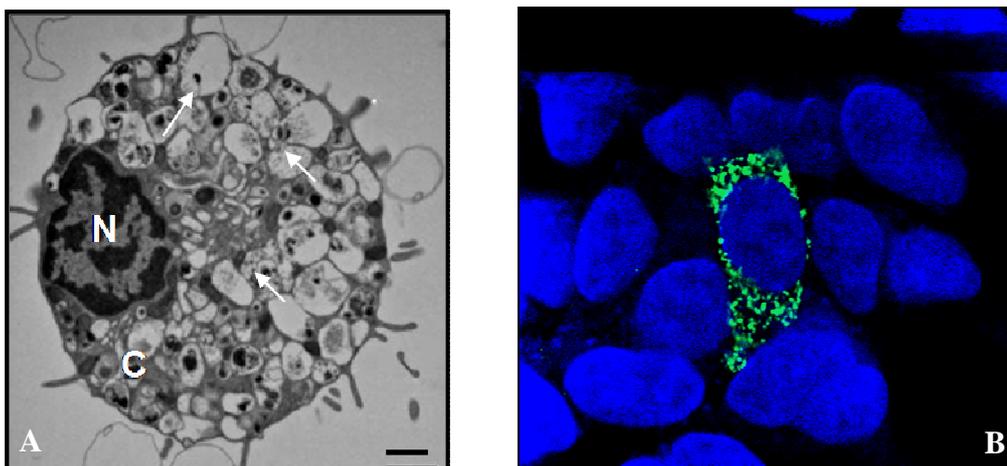
Le terme d'autophagie signifie littéralement « se manger soi-même ». C'est un processus cellulaire permettant la survie de la cellule eucaryote lorsque, notamment, la disponibilité en nutriments ou en facteurs de croissance s'affaiblit (Blommaert et al., 1997 ; Meijer et al, 2004). Elle est impliquée également dans la dégradation des protéines et macromolécules à demi-vie longue. De plus, elle contribue à l'élimination des organites endommagés, potentiellement délétères pour la cellule (comme par exemple, une mitochondrie produisant en excès des espèces oxygénées réactives). Au cours de l'autophagie, l'élément cellulaire à dégrader va être entouré par une double membrane phospholipidique formant une vacuole appelée « autophagosomes ». Cette structure va migrer à travers le cytoplasme vers le compartiment lysosomal. Après fusion membranaire, ce dernier va déverser ses protéases dans la vacuole de fusion (« autolysosome »), et ainsi en dégrader le contenu (Dunn W. A., 1994).

D'un point de vue mécanistique, les acteurs moléculaires impliqués dans l'élaboration de la réponse autophagie ont été essentiellement caractérisés par des études sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Tsukada et al., 1993 ; Harding et al., 1996). Parmi les nombreuses protéines identifiées régulant l'autophagie, deux d'entre elles sont exprimées durant la plus grande partie du processus et constituent des marqueurs d'autophagie *in vitro*. Il s'agit de Beclin-1<sup>36</sup>, un orthologue d'Atg6 chez la levure, associé à l'appareil de Golgi dans un

<sup>36</sup> Beclin-1 : Bcl-2 coiled-coil interacting protein-1, c'est un gène suppresseur de tumeur.

complexe multiprotéique contenant la PI3K<sup>37</sup>. Elle contrôle la formation de l'autophagosome dans le cytoplasme. Une autre protéine associée aux microtubules MAP-LC3<sup>38</sup>, est clivée et est associée à la membrane de l'autophagosome, jusqu'à sa fusion avec le compartiment lysosomal.

Lorsque le processus d'autophagie est infructueux, il peut conduire à la mort de type autophagique (ou mort de type II). La cellule présente une vacuolisation intensive (**figure 15A et 15B**) et l'accumulation d'autophagosome dans le cytoplasme conduit à la mort cellulaire (Codogno et al, 2005). Il ne semble pas apparaître pas de modifications nucléaires majeures, telles que la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN ou la rupture de la membrane nucléaire. Les voies de signalisations conduisant la « mort de type II » ne sont pas encore totalement caractérisées (Levine et al, 2005).



**Figure 15 : A. Photographie de microscopie électronique d'une cellule présentant une autophagie intensive. N : Noyau ; C : compartiment cytoplasmique. Le cytoplasme est rempli d'autophagosomes fusionnant pour certains avec le compartiment lysosomal (flèches). L'échelle représente 1 µm B. Marquage de la protéine MAPLC3-II en vert, typiquement associée à la membrane des autophagosomes, dans la lignée de neuroblastome SHSY5Y. Le noyau est marqué en bleu par le Topro-3. Objectif 100X.**

(A. D'après de Edinger et al., 2004, B. Photo personnelle)

<sup>37</sup> PIP3K : Phosphoinositide-3 Kinase

<sup>38</sup> MAP-LC3 : Microtubule-Associated Protein- Light Chain 3

## **II. Les acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de l'apoptose**

L'élimination des cellules endommagées ou sénescents, par apoptose, et inversement, la prolifération et la différenciation de cellules souches en cellules fonctionnelles, assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire. Cet équilibre physiologique est assuré par ces deux processus complémentaires, qui sont strictement contrôlés par des acteurs moléculaires, partiellement communs.

En ce qui concerne l'apoptose, les régulateurs moléculaires de l'élaboration de la réponse apoptotique appartiennent, le plus souvent, à la famille de protéines de type Bcl-2. Leur activation est sous la dépendance de « détecteurs moléculaires » de stress, telle que la protéine p53 (dont l'implication dans l'apoptose sera détaillée dans cette partie). Enfin, les effecteurs majeurs sont représentés par une famille de protéases, les caspases, impliquées dans les phases d'initiation et d'exécution de l'apoptose.

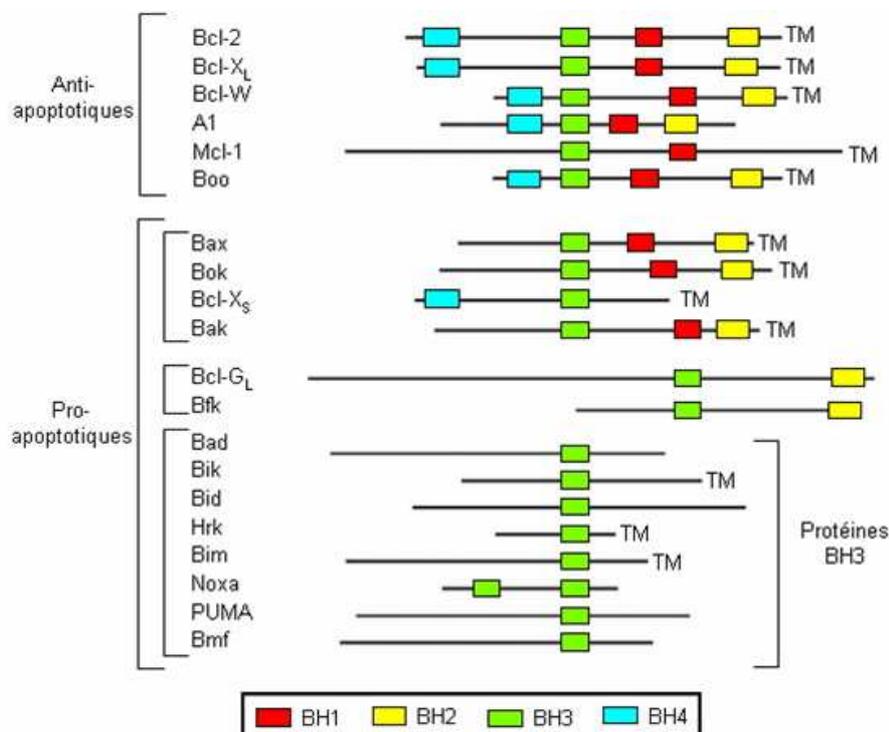
### **II.1 les régulateurs de l'apoptose : La famille Bcl-2**

#### **II.1.1 Généralités sur les membres de la famille Bcl-2**

Le gène *bcl-2* a été initialement caractérisé dans des cellules de lymphome de cellules B humaines de type 2. Dans cette pathologie, le gène transloqué est sous la dépendance du promoteur du gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines. Cette surexpression bloque l'apoptose (Strasser et al, 1997) et provoque la résistance des cellules suite à différents stimuli (déprivation en facteur de croissance, l'irradiation ou les molécules anticancéreuses). Le gène *bcl-2* a été le premier membre décrit d'une famille de gènes codant pour des régulateurs de l'apoptose (Larsen C. J., 1994). Ils possèdent de nombreux orthologues au sein des organismes invertébrés et des mammifères. Les membres de cette famille se divisent en deux sous-groupes fonctionnels, les membres pro-apoptotiques et les membres anti-apoptotiques.

## II.1.2 Structure des protéines de la famille Bcl-2

Quatre régions conservées ont été identifiées dans Bcl-2 et ont été retrouvées chez différents membres de cette famille. Elles ont été désignées BH1, BH2, BH3 et BH4 pour « Bcl-2 Homology ». Ces domaines protéiques sont impliqués dans la régulation des interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille et avec d'autres protéines cellulaires régulatrices de l'apoptose (Cory et al, 2002). Sur des bases de caractéristiques structurales et fonctionnelles, la famille Bcl-2 est habituellement divisée en trois principaux sous groupes (**figure 16**). Le premier, d'entre eux, regroupe les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, présentant les régions d'homologie BH1, BH2 et BH3 ou BH4 (sauf Bcl-X<sub>s</sub>). Le second regroupe les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bok, Bcl-Rambo, caractérisées par la présence de plusieurs régions d'homologies BH1, BH2, BH3, à l'exception notable de BH4. Enfin, le dernier sous-groupe appelé le groupe des protéines « BH3-only » est constitué d'un nombre croissant de protéines comme Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa, PUMA, Bcl-G etc... Elles sont composées d'une unique région d'homologie BH3, et contribuent à l'activité pro-apoptotique de Bax et/ou de Bak en favorisant leur oligomérisation.



**Figure 16 : Représentation schématique de la structure de différents membres de la famille Bcl-2.**

(D'après Strasser, A., 2005)

### *II.1.2.1 Les membres pro-apoptotiques*

Les protéines dont la fonction est de promouvoir l'apoptose sont représentés principalement par : Bax, Bcl-x<sub>s</sub>, Bik, Bak, Bad, Bid et Noxa (Zinkel et al, 2006). Ils possèdent plusieurs des domaines d'homologie (protéines à « multi-domaines ») à Bcl-2, notamment BH3. Ce domaine est suffisant pour qu'elles interagissent leur interaction avec les membres anti-apoptotiques, ainsi que pour exercer leur fonction pro-apoptotiques. Les protéines dites « BH3-only », comme Bad ou Bid sont également des activateurs potentiels de la mort cellulaire comme nous le verrons plus loin.

### *II.1.2.2 Les membres anti-apoptotiques*

Ceux-ci incluent majoritairement : Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1 et Bcl-2. Les domaines d'homologie BH1 et BH2 sont essentiels à leur fonction anti-apoptotique et à leur interaction avec Bax. Le domaine BH4 de Bcl-2 est indispensable à son hétérodimérisation avec Bax et à l'inhibition de l'apoptose. Celui-ci correspond à la première hélice- $\alpha$  des ces membres et est largement responsable du contrôle de leurs activités anti-apoptotiques (Huang et al., 1998).

### *II.1.2.3 Les protéines « BH3 only »*

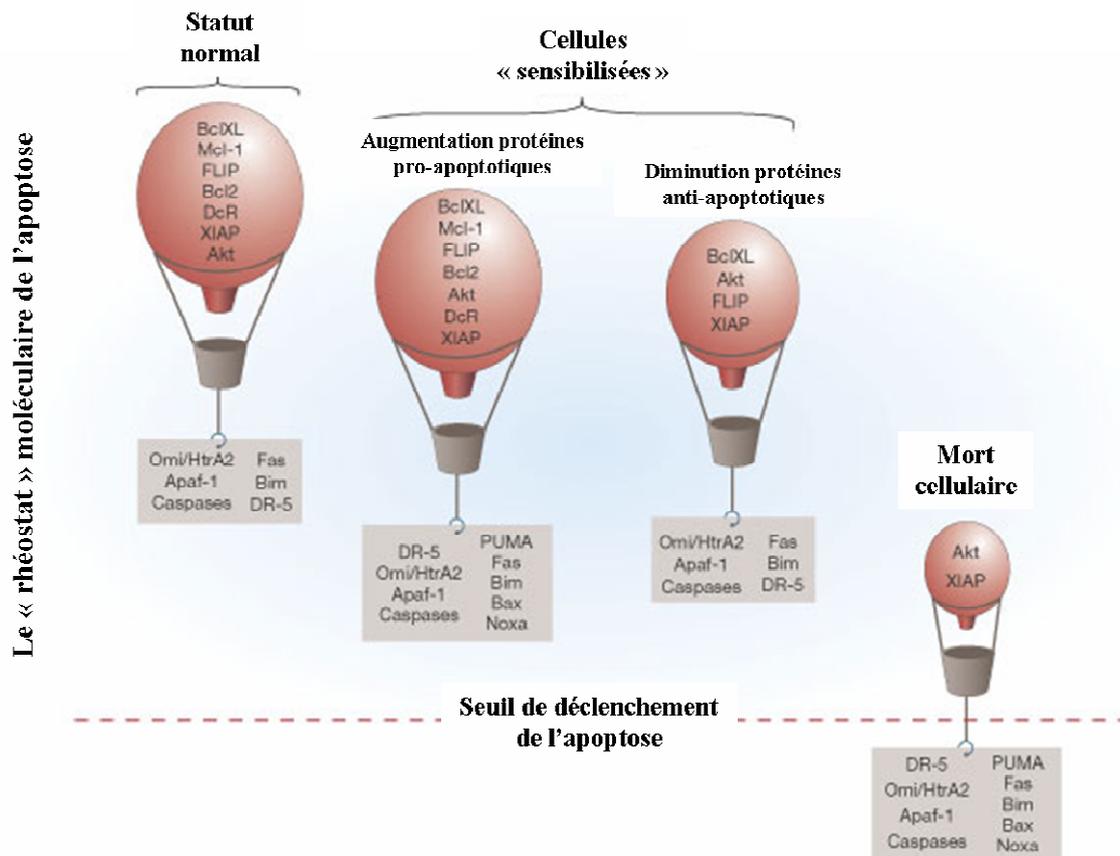
Il existe huit protéines « BH3 only » chez les mammifères (1 seule chez *C. elegans*). Ces protéines peuvent agir sur l'apoptose par deux mécanismes (Borner et al., 2003). Le premier consiste en l'inactivation des protéines anti-apoptotiques par liaison directe, l'autre par activation de protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou Bak. Ces protéines « BH3 only » peuvent être classées en deux sous-groupes : les « activateurs » (Bim, Bid) qui interagissent directement avec les protéines pro-apoptotiques et les « sensibilisateurs » qui n'interagissent qu'avec les protéines anti-apoptotiques, entraînant leur déplacement et la libération de protéines pro-apoptotiques.

La plupart de ces protéines contiennent une structure en hélice- $\alpha$  hydrophobe à leur extrémité C-terminale. Celle-ci leur permettrait d'interagir avec de nombreux compartiments intracellulaires, tels que, le réticulum endoplasmique, le noyau ou la mitochondrie (Akao et al., 1994).

## II.1.3 Régulations fonctionnelles des protéines de la famille Bcl-2

### *II.1.3.1 Le concept initial de la dimérisation*

Les mécanismes de régulation de l'activité des protéines codées par les gènes de la famille Bcl-2 reposent essentiellement sur des interactions (homodimérisations ou hétérodimérisations) entre les membres de cette famille. Par exemple, le dimère Bcl-2/Bcl-2 inhibe l'apoptose, le dimère Bcl-2/Bax également, alors que l'homodimère Bax/Bax est un promoteur de l'apoptose. Au cours des années 1990, l'équipe de Stanley J. Korsmeyer a proposé un modèle de « rhéostat moléculaire » du contrôle de la réponse apoptotique (Korsmeyer et al., 1993). D'après ce modèle, l'orientation de la cellule vers la survie ou la mort résulte du rapport entre les niveaux des activateurs et des inhibiteurs de l'apoptose (**figure 17**). Toutefois ce modèle ne tient pas compte des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles des acteurs impliqués, ni de leurs localisations intracellulaires, notamment des protéines « BH3 only » (Puthalakath et al., 2002). De plus, ces protéines ne comportant qu'un domaine BH3, comme Bad ou Bid, ne peuvent pas former d'homodimères et ne possèdent pas d'activité pro-apoptotique intrinsèque. En fait, ils rempliraient leur rôle pro-apoptotique en formant des dimères avec des membres inhibiteurs de l'apoptose (comme Bcl-x<sub>L</sub>). Ainsi, ils réduiraient la capacité de ceux-ci à former des homodimères protecteurs, et dans le même temps favoriseraient la constitution de dimères pro-apoptotiques.



**Figure 17: Représentation schématique du modèle de « rhéostat » moléculaire.**

(Adapté d'après Lowe et al., 2004)

### II.1.3.2 Par phosphorylation

En plus des niveaux d'expression respectifs de chaque membre et de leur capacité à former des dimères, le rôle des protéines de cette famille peut également être modulé par des modifications post-traductionnelles, telles que les phosphorylations (la phosphorylation empêche la dimérisation). Bien que de plus en plus d'articles décrivent la phosphorylation de Bax, nous évoquerons ici l'exemple le plus documenté de cette famille : la phosphorylation de la protéine Bad, qui a été étudiée dans notre équipe (Malissein et al., 2003).

En présence de facteurs de croissance liés à leurs récepteurs membranaires, Bad est phosphorylée par la voie de la kinase Akt/PKB. Ceci entraîne l'association de Bad avec la protéine cytosolique 14-3-3. En période de stress trophique, Bad n'est plus phosphorylée et ne peut être alors séquestrée par la 14-3-3. Une fois le domaine BH3 de Bad ainsi libéré, celle-ci peut interagir avec Bcl-x<sub>L</sub>, inhibant ainsi son action protectrice, libérant à son tour Bax et Apaf-1. D'autres travaux suggèrent que la protéine Bax peut également être séquestrée dans le

cytoplasme par l'isoforme 14-3-30, indépendamment de la phosphorylation de Bax (Nomura et al., 2003).

Un autre exemple de régulation par phosphorylation est celui de Bcl-2. Après traitement des cellules avec du Taxol (agent chimiothérapeutique) ou l'utilisation d'acide okadaïque (inhibiteur de phosphatase), la protéine Bcl-2 est phosphorylée sur des résidus sérine 70 et 87 (Basu et al., 2006), rendant Bcl-2 incapable d'inhiber l'apoptose.

#### *II.1.3.3 Par clivage*

Un autre mécanisme de régulation des protéines de la famille Bcl-2, est leur clivage, entraînant leur activation fonctionnelle. L'exemple le plus documenté est celui de Bid qui devient active après protéolyse spécifique. Lors de l'initiation de la signalisation apoptotique par les récepteurs de mort, et si la réponse de mort engendrée n'est pas suffisante, la caspase-8 clivera alors Bid (tBid) au niveau de son extrémité C-terminale. Le domaine BH3 de tBid est alors démasqué et l'augmentation de sa surface hydrophobique provoque sa translocation du cytosol vers la membrane mitochondriale. En ce qui concerne Bax, il semblerait que dans le cas d'une apoptose induite par l'étoposide ou la staurosporine, une étape de clivage au niveau N-terminal interviendrait via une calpaïne mitochondriale. Le fragment C-terminal de 18 kDa généré n'interagirait pas avec Bcl-2 (contrairement à la forme non clivée), mais serait transféré à la mitochondrie favorisant la libération de facteurs pro-apoptotique tels que le cytochrome c et l'activation de la caspase-3 (Wood et al., 1998 ; Cao et al., 2003 ; Toyota et al., 2003).

#### *II.1.3.4 Les isoformes protéiques*

Jusqu'à présent peu de travaux ont porté sur le rôle de ces protéines au cours de la mort cellulaire contrôlée, en fonction de l'isoforme exprimée. Il a été mentionné que PUMA présentait deux isoformes,  $\alpha$  et  $\beta$  (Nakano et al., 2001), sans que leur rôle soit caractérisé. Parmi les protéines étudiées, se sont les isoformes de Bax qui sont les plus décrites, mais sans que leur rôle exact ne soit toujours caractérisé. L'équipe de F. Valette à Nantes, a décrit en détail l'isoforme Bax  $\psi$  (Cartron, 2002), et a également abordé le mécanisme d'activation de bax par des changements conformationnels. Ceux-ci furent particulièrement étudiés pour l'activation de l'isoforme mitochondrial, Bax- $\alpha$ . Selon ce modèle, à la suite d'un stimulus apoptogène, Bax- $\alpha$  subit, dans le cytosol, des modifications conformationnelles entraînant l'ouverture de son hélice- $\alpha$  (H $\alpha$ 9) exposant ainsi son domaine formant le pore et permettant l'accessibilité à son domaine BH3 (Cartron et al., 2005).

## II.2 Les effecteurs de l'apoptose : les caspases

Les caspases forment une autre famille protéique conservée au cours de l'évolution. Elles sont les principales exécutrices du programme apoptotique initié par les protéines de la famille Bcl-2 (Rupinder et al, 2007). Toutefois, il existe des caspases initiatrices (dîtes d'amont), activées principalement lors de l'activation de la voie des récepteurs de mort. Elles correspondent à des cystéines protéases clivant leurs substrats après un résidu acide aspartique, d'où le terme de « cystéine-**Asp**-protéase » ou caspases. Plus de 14 caspases ont été caractérisées et beaucoup d'entre elles sont présentes chez l'Homme.

### II.2.1 Classification fonctionnelle des caspases

Les caspases peuvent être classées en fonction de leur rôle dans la cascade réactionnelle de la réponse apoptotique (**figure 18A**). On distingue, les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9, -10) qui ont pour fonction d'activer de manière hiérarchique et en cascade, les caspases effectrices (caspase-3, -6, -7). Une fois activées, ces dernières reconnaissent sur leur substrat cible un motif térapeptidique, se terminant par un résidu aspartate définissant le site de clivage. Les caspases effectrices participent activement à la destruction de la cellule, en clivant spécifiquement différents substrats cytosoliques et nucléaires (Riedl et al, 2004). En outre, les caspases initiatrices et effectrices se distinguent par la structure de leur prodomaine, ainsi que les conséquences fonctionnelles en découlant. Les caspases initiatrices possèdent un prodomaine long, contenant des motifs d'interactions protéines-protéines, tels que les domaines DED<sup>39</sup> pour les caspase-8 et -10 ou le domaine CARD<sup>40</sup> pour les caspase-2, -9. Ainsi, elles peuvent d'être recrutées au niveau de complexes protéiques de signalisation, puis s'auto-activer. Les caspases effectrices possèdent quant à elles un prodomaine plus court, les empêchant de s'auto-activer, et de s'oligomériser. Elles nécessitent l'intervention d'autres caspases ou du granzyme B par exemple.

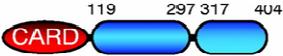
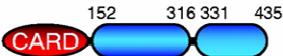
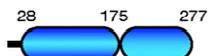
Un dernier groupe a été défini comme des caspases inflammatoires (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14). Celles-ci participent au contrôle de la réponse immunitaire inflammatoire, en clivant et activant des médiateurs de la communication lymphocytaire tel que l'interleukine-1 $\beta$  (caspase-1), l'interleukine-18 (caspase-4), l'interleukine-1F7b (caspase-5), cytokines pro inflammatoires. Toutefois, malgré sa présence dans ce groupe de caspase, la

---

<sup>39</sup> DED : Death Effector Domain

<sup>40</sup> CARD : CAspase Recruitment Domain

caspase-14 est impliquée dans la différenciation kératinocytaire (Nicotera et al., 2007) plutôt que dans l'apoptose ou l'inflammation. De la même manière, la caspase-12 (localisée au niveau du réticulum endoplasmique), régule l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique. Elle est provoquée par l'accumulation de protéines anormales ou de perturbations de l'homéostasie calcique. Elle serait impliquée dans de nombreuses pathologies du système nerveux central comme par la maladie d'Alzheimer.

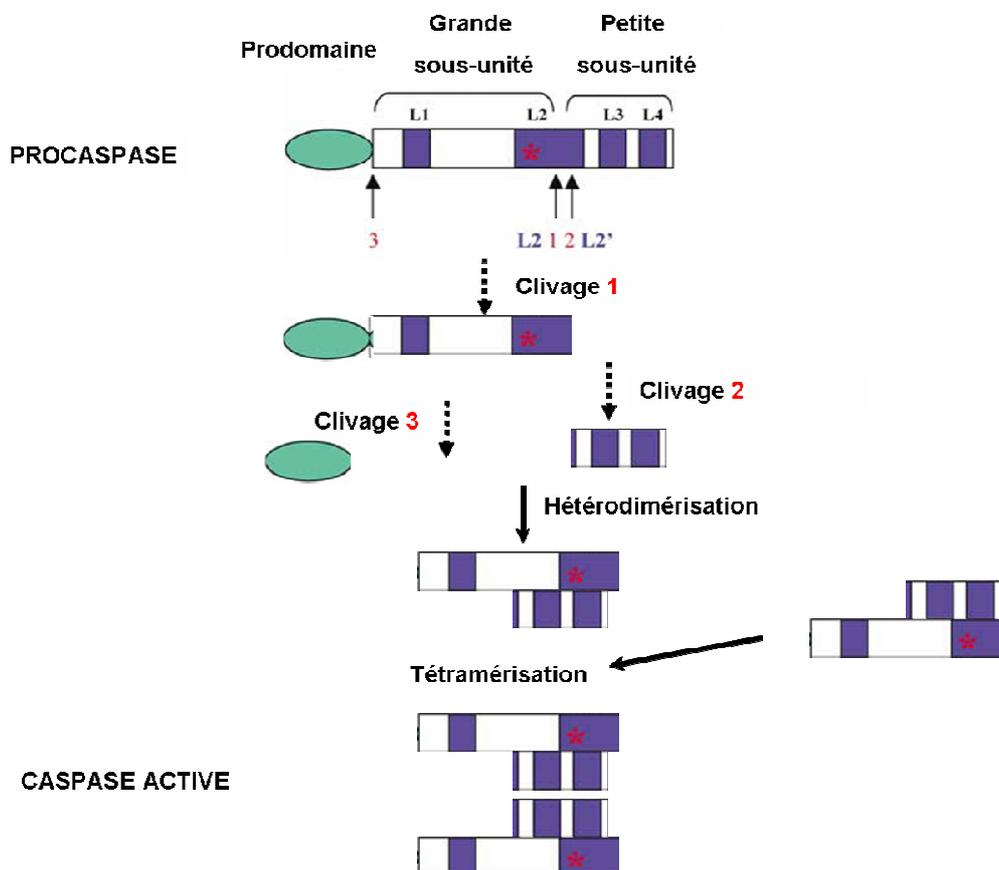
	<i>Structure des procaspases</i>	<i>Séquence de substrat spécifique</i>	<i>Fonction</i>	<i>Type de caspase</i>
Caspase-1		WEHD YEVD	Inflammation	
Caspase-2		DEHD VDVAD	Apoptose	<b>Initiatrice</b>
Caspase-3		DEVD DNQD	Apoptose	<b>Effectrice</b>
Caspase-4		LEVD (W/L)EHD	Inflammation	
Caspase-5		(W/L)EHD	Inflammation	
Caspase-6		VEID VEHD	Apoptose	<b>Effectrice</b>
Caspase-7		DEVD	Apoptose	<b>Effectrice</b>
Caspase-8		(I/L)ETD	Apoptose	<b>Initiatrice</b>
Caspase-9		LEHD	Apoptose	<b>Initiatrice</b>
Caspase-10		IEAD	Apoptose	<b>Initiatrice</b>
Caspase-14		?	Différenciation kératinocytaire	

**Figure 18A : Structure protéique et classification des procaspases.**

Les séquences de substrat spécifiques ainsi que leur domaine d'implication fonctionnel sont également mentionnés. (D'après Hill et al, 2003)

## II.2.2 Structure et activation enzymatique des procaspases

Les caspases sont synthétisées sous forme d'une enzyme inactive ou zymogène. Ces procaspases sont composées de trois segments principaux : une petite sous-unité en C-Terminale, une grande sous-unité renfermant le site catalytique et un prodomaine situé dans la partie N-Terminale. L'activation des caspases se déroule en deux étapes (**figure 18B**) : il se produit d'abord deux clivages, par une autre caspase dite « initiatrice » ou par auto-clivage (caspase-8), au niveau des résidus aspartate libérant la petite sous-unité. Un dernier aspartate est la cible d'un troisième clivage libérant le prodomaine permettant ainsi à la petite et à la grande sous-unité de s'hétérodimeriser. Enfin, la caspase catalytiquement active est un tétramère de deux hétérodimères, possédant donc deux sites catalytiques.



**Figure 18B : Activation des procaspases.**

Activation par trois clivages protéolytiques successifs, suivis d'une tétramérisation pour former la caspase active. Les bandes bleues représentent des domaines protéiques en boucles (« Loop », L1, L2, L3, L4). Les flèches pleines représentent les sites de clivages et les numéros correspondent à l'ordre dans lequel ils s'effectuent. L'astérisque rouge indique la cystéine du site catalytique, L2 et L2' sont les domaines responsables de l'hétérodimérisation.

(Modifié d'après Degterev et al, 2003)

### II.2.3 Quelques exemples types de substrats de caspases

Au cours de la réponse apoptotique, les caspases effectrices peuvent être comparées à de petits ciseaux découpant spécifiquement des petits «bouts» de la cellule menant *in fine* à sa mort. Plus d'une centaine de protéines substrats des caspases (Lüthi et al, 2007) ont été décrites, notamment lors de l'apoptose (**Tableau 4**). Parmi elles, on peut citer une enzyme de réparation nucléaire, la PARP (poly-ADP Ribose Polymerase). Elle est la cible majeure du clivage protéolytique par les caspases effectrices qui l'inactivent. D'autres protéines de structure de l'architecture cellulaire comme, la gelsoline ou certaines lamines de l'enveloppe nucléaire, la fodrine, la  $\beta$ -caténine, sont également clivées. Les caspases effectrices peuvent aussi inactiver par clivage, certaines protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2 ou Bcl-x<sub>L</sub>, contribuant ainsi à précipiter irréversiblement la cellule vers la mort.

Parmi les caspases effectrices majeures, la caspase-3 est l'une des plus représentatives de part la nature de ses substrats et ses voies d'activation. En effet, elle catalyse le clivage de nombreuses protéines essentielles pour la survie cellulaire comme la PARP, la PKC $\gamma$ , ICAD<sup>41</sup> responsables de la fragmentation de l'ADN, DNA-PK, elle active aussi la procaspase-6. Les protéines impliquées dans la machinerie traductionnelle, tels que des facteurs d'initiation de la traduction, comme eIF4GI, eIF2 $\alpha$ , sont également des cibles de la caspase-3. D'autres cibles sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, comme p21<sup>WAF1</sup>, dans l'adhésion cellulaire à la matrice, comme FAK (Focal Adhesion Kinase) ou dans l'architecture cytosquelettique, comme l'actine ou l' $\alpha$ -adductine. La procaspase-3 peut être activée, via la caspase-9, lorsque le stress appliqué passe par la voie mitochondriale de l'apoptose (discutée plus bas), ou via la caspase-8.

La caspase-8, est très souvent impliquée dans la signalisation de mort initiée par l'activation de récepteurs dits « de mort » par liaison de leurs ligands. C'est, une caspase initiatrice qui va alors activer, en cascade, la caspase-3. Néanmoins, elle pourrait être aussi considérée dans certains cas comme une caspase effectrice, car elle peut cliver et activer le facteur pro-apoptotique Bid, qui va se lier à des protéines mitochondriales. Ainsi, la caspase-8 constitue le lien entre les deux voies moléculaires majeures de l'apoptose.

---

<sup>41</sup> ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease

SUBSTRATS	TYPES DE PROTEINES
Bid, Caspases, DFF45, p28BAP31 ( <i>pro-apo.</i> ) Bcl-2, Bcl-x <sub>L</sub> , FLIP <sub>L</sub> , XIAP, IKKβ ( <i>anti-apo.</i> ) IL-1β, IL-16, IL-18 ( <i>pro-inflam.</i> )	Régulateurs apoptotiques et inflammatoires
DNA-PK, Raf-1, Wee1, Akt, RasGAP, PP2A, FAK, RIP MEKK1	Protéines kinases et acteurs de la transduction du signal
A-fodrine, Actine, β-actine, Lamine A, B, C, Gelsoline, DNA polymérase I, Topoisomérases I et II	Protéines structurales, cytoplasmiques et nucléaires
PARP, DNA-PK, RAD51, ATM  P27, p21, Wee1, MDM2  Huntingtine, APP	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Facteurs de la réparation de l'ADN</li> <li>- Régulateurs du cycle cellulaire</li> <li>- Facteurs associés à des pathologies</li> </ul>

**Tableau 4 : Quelques substrats des caspases au cours de l'apoptose.**

Il existe une base de données regroupant tous les substrats actuellement connus des caspases :

[www.casbah.ie](http://www.casbah.ie) (site créé par Alexander Lüthi)

### II.3 Les inhibiteurs de l'apoptose : l'exemple des IAPs

L'activation ou l'inactivation des caspases est régulée par de nombreuses protéines, des ions (tel le Ca<sup>2+</sup>), ou des facteurs tels que, les protéines de la famille Bcl-2, la calpaïne, le CrmA<sup>42</sup> et les IAPs<sup>43</sup>.

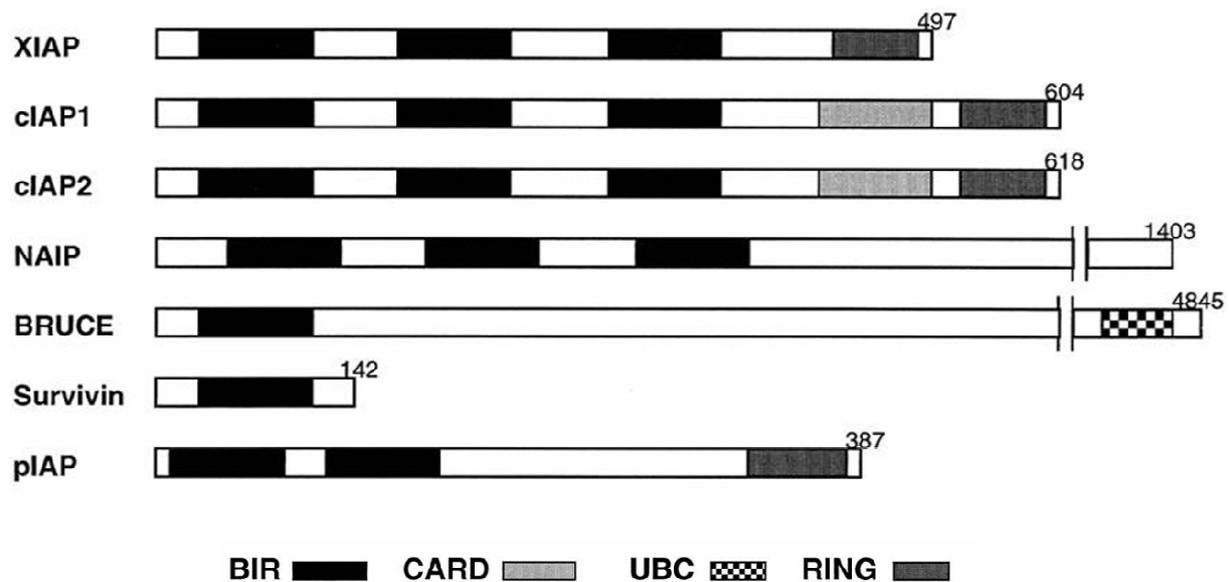
Les inhibiteurs de l'apoptose ou IAPs représentent une famille de protéines inhibitrices des caspases (Clem et al, 1997 ; Hunter et al, 2007), initialement découverte chez les Baculovirus (virus d'insectes). Ils empêchent l'activation « accidentelle » ou spontanée des caspases, en établissant un seuil à partir duquel celles-ci peuvent dégrader la cellule. Chez l'Homme, cette famille regroupe pour le moment au moins six membres (**figure 19**), tels que cIAP1, cIAP2, XIAP<sup>44</sup>, NAIP<sup>45</sup>, la survivine et la livine.

<sup>42</sup> CrmA : Cytokine response modifier A

<sup>43</sup> IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins

<sup>44</sup> XIAP : X-linked mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein

Tous les IAPs contiennent une ou plusieurs copies de la répétition caractéristique des IAPs de Baculovirus : le motif BIR<sup>46</sup>. Ce motif correspond à un domaine conservé de structure en « doigt de zinc », nécessaire et suffisant pour leur activité anti-apoptotique. En effet, c'est par ce domaine que les IAPs se lient aux caspases au niveau des sites catalytiques de ces dernières, empêchant, par conséquent, toute activation du zymogène. La survivine a été décrite comme étant préférentiellement impliquée dans la régulation de la mitose plus que dans celle de l'apoptose (Altieri, D. C., 2003). Un autre domaine particulier se situe en C-Terminal des IAPs, il s'agit du domaine RING<sup>47</sup>. C'est via ce dernier que les IAPs sont en relation avec des enzymes de polyubiquitylation. Une hypothèse est que ce domaine pourrait faciliter la dégradation des caspases y étant liées. L'activité de ces IAPs cellulaires peut être négativement régulée par des protéines mitochondriales tels que Smac/DIABLO. Ainsi, ces IAPs représentent un point de contrôle supplémentaire dans la régulation de l'activité des caspases et du processus d'apoptose.



**Figure 19 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels présents sur les IAPs.**

UBC représente l' « Ubiquitin Conjugating Domain » nécessaire à leur dégradation par le protéasome 26S.

(D'après Deveraux et al, 1999)

<sup>45</sup> NAIP : Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

<sup>46</sup> BIR : Baculovirus IAPs Repeat

<sup>47</sup> RING : Really Interesting New Gene

### III. Les voies de signalisations apoptotiques

Au cours du processus d'apoptose, il convient de distinguer deux voies moléculaires majeures responsables de son initiation et son exécution. Il s'agit tout d'abord d'une voie « extrinsèque », impliquant à son origine des « récepteurs de mort » membranaires, qui une fois liés à leur ligands, entraînent l'activation de la procaspase-8 (ou FLICE) via des protéines adaptatrices déclenchant ainsi la cascade apoptotique. L'autre, est indépendante des récepteurs de mort et est souvent qualifiée de voie « intrinsèque ». En effet, elle a été initialement décrite comme étant induite par des stress métaboliques (absence de facteurs de croissance, agressions chimiques, irradiations UV ou  $\gamma$ , les chocs thermiques, l'hypoxie ...), aboutissant fréquemment à des dommages à l'ADN, à la production de radicaux libres. Cette voie place la mitochondrie au centre de sa régulation. En règle générale, la nature des caspases initiatrices activées est déterminée par l'engagement spécifique d'une de ces voies apoptotiques. Nous allons examiner ces deux voies de transduction du signal de mort, ainsi que les interactions fonctionnelles existantes entre elles.

#### III.1 La voie apoptotique « extrinsèque » ou la voie des récepteurs de mort

L'activation de la voie apoptotique « extrinsèque » (**figure 20**) nécessite l'intervention de récepteurs membranaires dits « de mort » (ou DR pour Death Receptor), appartenant à la superfamille du récepteur du TNF- $\alpha$ <sup>48</sup>. La famille des TNF-R est une famille de plus de vingt membres parmi lesquels les récepteurs de mort (DR1 à DR5) partagent des séquences d'homologie, dans leur domaine intracytoplasmique, responsables de la signalisation apoptotique. Nous nous limiterons à décrire deux d'entre eux : Fas et TNFR-1 (Marchetti P., 2005). Ces derniers sont les mieux définis et les plus caractéristiques de cette classe de protéines.

---

<sup>48</sup> TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

### III.1.1 Recrutement de la voie des récepteurs de mort

A l'origine de l'activation des deux récepteurs de mort (Fas, TNFR1) se trouve la liaison à leur ligand spécifique : FasL<sup>49</sup> ou TNF-2. L'activation de ces récepteurs est suivie de leur oligomérisation au niveau de la membrane plasmique. Ce recrutement entraîne des changements conformationnels dans leur domaine intracytoplasmique initiant un signal de mort.

### III.1.2 Transduction du signal apoptotique

Les modifications de conformation ont pour conséquence le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques, telles que FADD<sup>50</sup> ou TRADD<sup>51</sup>, qui à leur tour vont recruter les procaspases initiatrices -8 (ou -10). Les procaspase-8 vont alors s'oligomériser, via leur domaine DED. Elles vont puis former avec les récepteurs et les protéines adaptatrices, un complexe multi-protéique sous-membranaire nommé DISC : le « Death-Inducing Signal Complex ». En son sein, il y aura auto-activation de la procaspase-8 en caspase-8 active. Classiquement, on décrit un clivage sous-jacent des substrats cibles, en fonction du type cellulaire<sup>52</sup>. Dans les cellules du type I (cellules de type lymphoïde), la caspase-8 fortement activée, clive de manière directe la procaspase-3, activant l'exécution de l'apoptose. Dans les autres cellules, de type II, la caspase-8 est recrutée de manière plus modeste et est incapable d'activer directement la procaspase-3 (Fan et al, 2005). Néanmoins, elle peut via la protéine « BH3-only », Bid, activer la voie mitochondriale, entraînant la libération de facteur comme le cytochrome c ou encore l'AIF, et l'exécution de l'apoptose. Elle apparaît comme une voie d'amplification du signal de mort en sus de la voie mitochondriale.

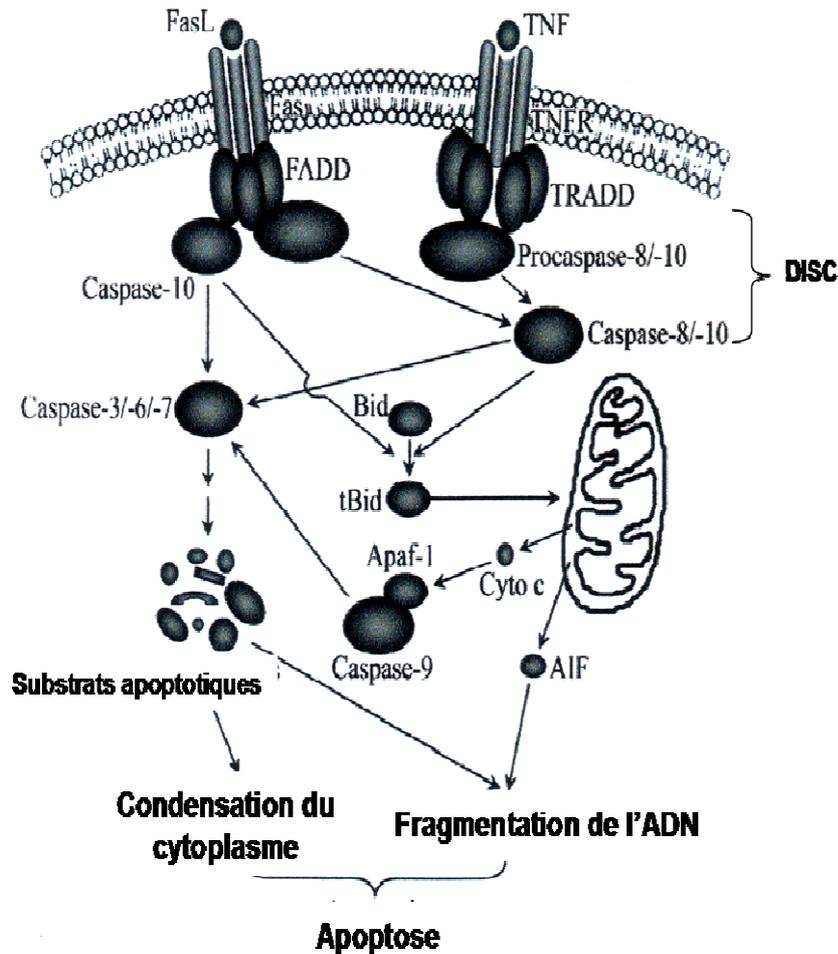
---

<sup>49</sup> FasL : Fas Ligand

<sup>50</sup> FADD : Fas-Associated Death Domain

<sup>51</sup> TRADD : TNFR-Associated Death Domain

<sup>52</sup> Cette distinction est de plus en plus abandonnée au profit d'un type de réponse lié à la nature et à la quantité de ligand. Par commodité, on décrira, cependant les deux types de cellules.



**Figure 20 : Principe de l'activation de la voie apoptotique dépendante des récepteurs de mort.**

Les ligands se lient à leur récepteur correspondant, provoquant un changement de conformation des protéines adaptatrices associées au récepteur, puis l'activation des caspases impliquées.

(Adapté d'après Fan et al, 2005)

Malgré la similitude de leur mécanisme d'activation au sein de cette voie, la nature des ligands des récepteurs de mort et des protéines adaptatrices, varie favorisant une régulation plus fine du processus de mort. Citons l'exemple de la procaspase-2. Celle-ci est recrutée en réponse à la fixation d'un ligand de mort à son récepteur, via des protéines adaptatrices cytoplasmiques particulières, telles que, RIP<sup>53</sup>, RAIDD<sup>54</sup> (Duan et al., 1997). Néanmoins, des données actuelles sur la spécificité des substrats de la caspase-2 sont limitées.

<sup>53</sup> RIP : Receptor-Interacting Protein

<sup>54</sup> RAIDD : RIP-Associated ICH1-CED3 homologous protein with a Death Domain

La caspase-10, quant à elle, peut aussi être recrutée indépendamment de la caspase-8. Dans la sélection négative des lymphocytes T auto-réactifs, la stimulation des récepteurs Fas et TNFR active la mort cellulaire de type « caspase-10 dépendante ».

### III.1.3 Régulation de la voie extrinsèque

Parmi les régulateurs connus de cette voie, on peut citer la protéine FLIP<sup>55</sup>. C'est un homologue structural de la caspase-8, mais dépourvu de domaine catalytique. Elle a la capacité d'entrer en compétition avec la procaspase initiatrice, elle est alors recrutée à la place de la caspase-8 au sein du DISC, entraînant une absence d'auto-activation (pas de domaine catalytique) et l'arrêt de la propagation du signal en aval.

## III.2 La voie apoptotique « intrinsèque » ou voie mitochondriale

La voie des récepteurs de mort est activée par un nombre relativement restreint de ligands, à l'inverse la voie indépendante des récepteurs de mort ou voie mitochondriale, est recrutée par de nombreux signaux de stress. La perméabilisation de la membrane mitochondriale apparaît comme l'évènement déclencheur clé de l'exécution de l'apoptose. Cependant, de manière moindre, la mitochondrie est aussi impliquée au cours de la nécrose et de l'autophagie. Nous allons maintenant décrire les différentes formes que peut prendre cette apoptose mitochondriale.

### III.2.1 La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe

La rupture de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe, MOM : « Mitochondrial Outer Membrane » peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes impliquant différents acteurs moléculaires.

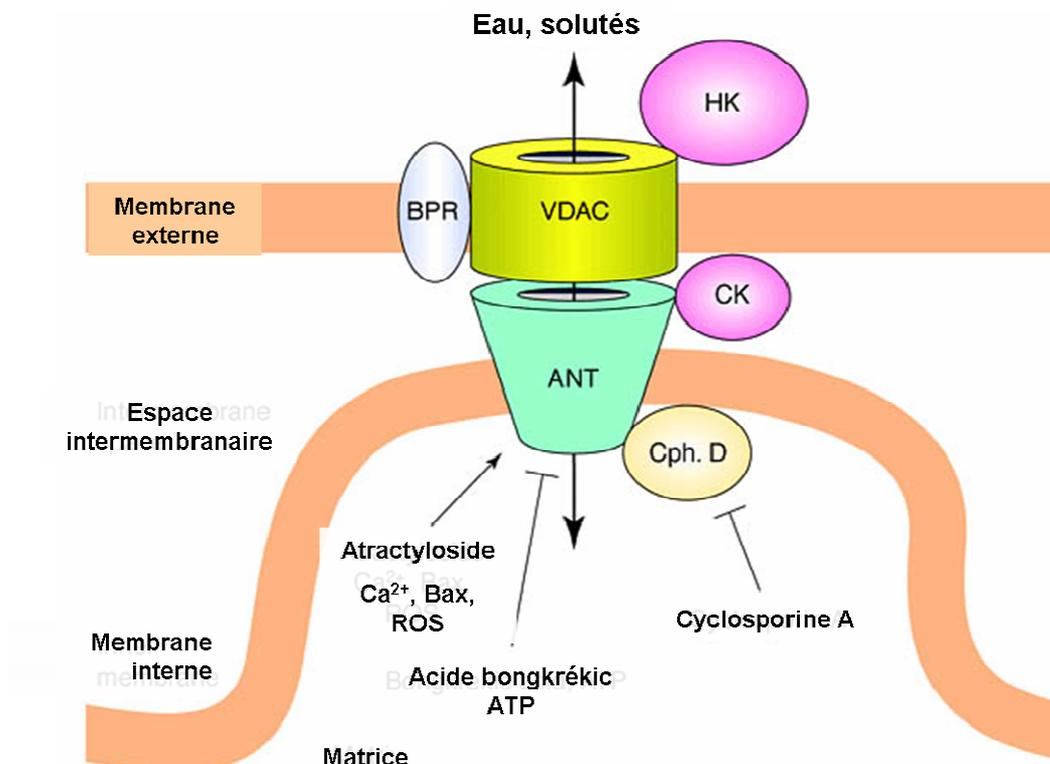
#### *III.2.1.1 Le pore de transition de perméabilité mitochondriale*

Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) ou mégapore mitochondrial (**figure 21**), est un complexe multiprotéique comprenant différents membres (Rasola et al., 2007). Toutefois, il semble que sa composition puisse varier, sans qu'on puisse l'expliquer à ce jour, ni comprendre réellement le rôle de certaines protéines. Il s'agit du

---

<sup>55</sup> FLIP : FLice-Inhibitory Protein

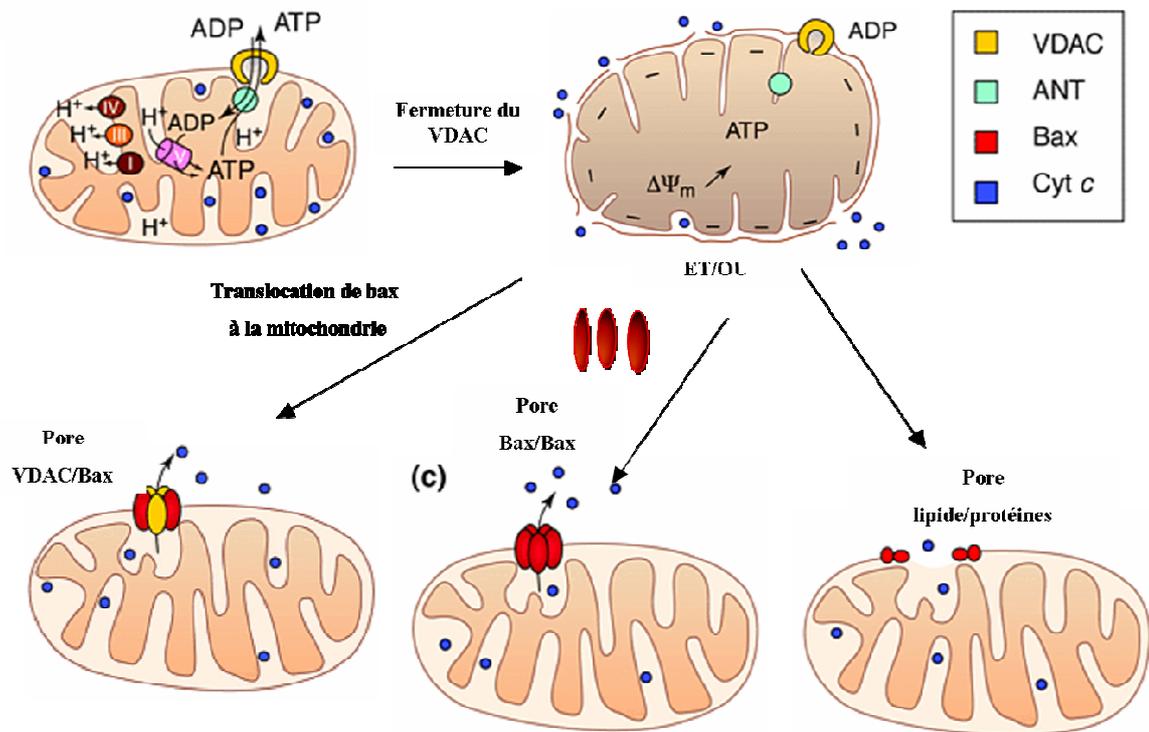
VDAC, un transporteur d'anions, formant un canal situé dans la membrane externe, tandis que l'ANT, est une protéine qui réalise l'échange de nucléotides (ATP/ADP) au niveau de la membrane interne. Au sein de ce complexe, se retrouve aussi, la forme ubiquitaire du récepteur aux benzodiazépines (BPR), situé dans la membrane externe, alors que l'hexokinase (HK) est présente sur la face cytoplasmique de la membrane mitochondriale externe. La créatine kinase (CK) est présente sur la face cytoplasmique de la membrane mitochondriale externe. La créatine kinase (CK) est retrouvée dans l'espace intermembranaire. Enfin, la cyclophiline D est localisée sur le feuillet matriciel de la membrane mitochondriale interne.



**Figure 21: Le complexe protéique du mégapore mitochondrial.**

BPR : Récepteur périphérique aux benzodiazépines ; VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel ;  
 ANT : Adenine Nucleotide Translocator channel ; HK : HexoKinase ; CK : Creatine Kinase ; Cph. D:  
 Cyclophiline D. (Document MH. RATINAUD, d'après Desagher et al., 2000)

Lorsque la cellule est intacte, le VDAC et l'ANT forment un pore de faible conductance. Il peut s'ouvrir (**figure 22**) sous l'effet de différents stress et/ou par l'insertion d'une protéine pro-apoptotique, comme Bax- $\alpha$ . Son ouverture, correspondant à une augmentation de sa conductance, provoque un mouvement d'ions et de solutés entraînant un effondrement du potentiel membranaire mitochondrial. Ces changements vont induire un gonflement de l'organe et aboutir au relargage de petites molécules apoptotiques, selon plusieurs mécanismes proposés, qui ne s'excluent pas (Kroemer et al, 2007).



**Figure 22: Modèles de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe**  
(Document MH RATINAUD)

### *III.2.1.2 Les protéines de la famille Bcl-2*

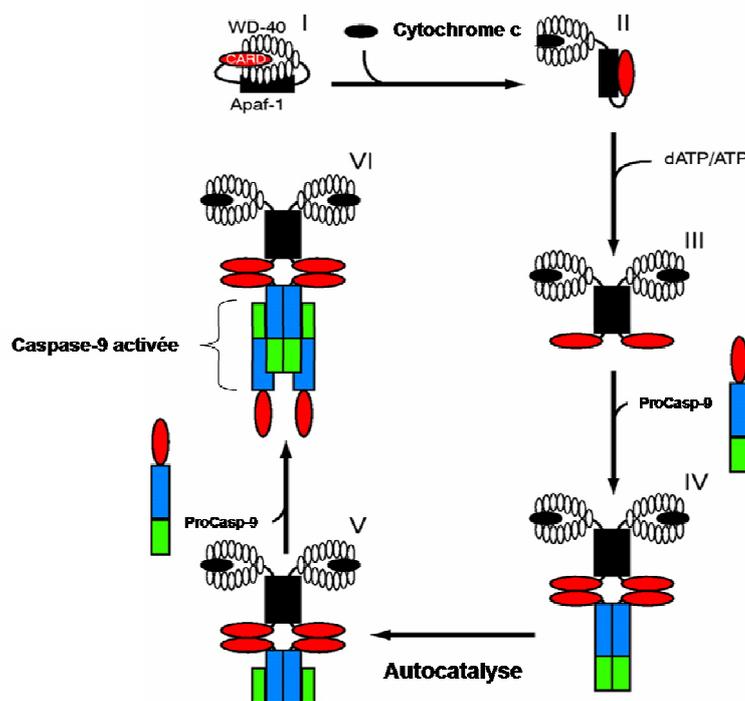
Il a été décrit un second mécanisme de perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, impliquant des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Auparavant, il faut distinguer les protéines (ou les isoformes) possédant un domaine d'ancrage à la mitochondrie (Bax- $\alpha$ , Bcl-X<sub>s</sub>...) et ceux n'en possédant pas (Bax- $\beta$ , t-Bid, Bad, PUMA...). L'exemple le plus étudié est bax- $\alpha$  (l'isoforme de Bax ayant des propriétés pro-apoptotiques et formant par oligomérisation des pores dans la MOM). Toutefois, même pour cette isoforme de Bax, plusieurs mécanismes d'insertion et de formations du pore ont été décrits à ce jour, sans qu'on puisse en privilégier un. C'est pour cela que nous détaillerons les deux mécanismes proposés pour Bax- $\alpha$ . La première hypothèse propose qu'après l'activation de Bax, plusieurs sous-unités de bax alpha s'oligomérisent et forment un pore avant de s'insérer dans la membrane mitochondriale externe (Cartron et al., 2005). Cependant, ceci implique un pore uniquement formé de sous-unité Bax- $\alpha$ . La seconde hypothèse suggère que c'est au sein même de la membrane mitochondriale externe (Annis et al., 2005) que Bax s'oligomériserait (seul ou avec d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2). Enfin, les protéines à domaines « BH3 only », telles que PUMA, Bid ou bien Noxa et Bad, apportent un niveau de contrôle supplémentaire aux facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak. Elles peuvent les activer directement (changement conformationnel) ou remplir un rôle d'agoniste, comme Bad, amplifiant ainsi le signal de mort à la mitochondrie. Parmi ces protéines, certaines constituent des relais entre les deux voies de contrôle de l'apoptose, telles que tBid ou p53 (**figure 23**).



## III.2.2 Les agents pro-apoptotiques libérés de la mitochondrie

### III.2.2.1 le cytochrome *c*

Le cytochrome *c* a été initialement décrit comme une protéine navette transporteur d'électrons entre les complex III et IV de la chaîne respiratoire. Depuis une dizaine d'année, des fonctions nouvelles lui ont été attribuées, comme protéine effectrice de la signalisation de mort. Après perméabilisation de la membrane mitochondrial externe, le cytochrome *c* sera expulsé de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme, où il va se complexer à une protéine adaptatrice l'Apaf-1<sup>56</sup>. Ceci va entraîner l'oligomérisation de cette dernière en présence d'ATP. Puis va se fixer à ce complexe la procaspase-9 qui s'y lie, via son domaine CARD (Shi, Y., 2006), pour former l'apoptosome (**figure 24**). La procaspase-9 va au sein de ce complexe subir deux clivages protéolytiques et être ainsi activée. Elle va ensuite à son tour recruter la caspase-3 et -7 et entraîner irrévérablement la cellule vers l'apoptose.



**Figure 24: Modèle moléculaire de la formation de l'apoptosome et de l'activation de la procaspase 9.**

Apaf-1 (étape I) va subir un changement conformationnel suite à la fixation du cytochrome *c* (étape II) exposant ainsi son domaine CARD. Après fixation du co-facteur dATP (étape III), Apaf-1 dimérise et interagit avec une procaspase-9 via son domaine CARD (étape IV) formant l'apoptosome. Ceci entraîne un autoclivage de la procaspase-9 (étape V). Le double clivage protéolytique d'une autre procaspase-9 aboutit à la tétramérisation et à la formation de la caspase-9 active (étape VI). (Adapté de Hill et al, 2003)

<sup>56</sup> Apaf-1 : Apoptosis Protease-Activating Factor 1

### *III.2.2.2 L'AIF*

L'AIF (Apoptosis Inducing Factor) est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial est l'AIF. C'est une flavoprotéine possédant des séquences d'homologies avec les oxydoréductases bactériennes. Comme le cytochrome *c*, l'AIF est une protéine bifonctionnelle. Dans des conditions physiologiques, sa fonction est l'oxydation du NADH (Susin et al., 1999). Toutefois, sous l'effet d'une signalisation de mort, l'AIF peut être libérée de la mitochondrie et constitue un promoteur de l'apoptose (Daugas et al., 2000 ; Lipton et al., 2002). Une fois dans le cytoplasme, l'AIF se relocalise au niveau nucléaire, et active des enzymes (endonucléases G ou endoG) responsables de la fragmentation de l'ADN. Cette mort est souvent décrite comme l'exemple d'une mort cellulaire de type « caspase indépendante ».

### *III.2.2.3 Smac/DIABLO*

La protéine connue sous une double dénomination : Smac/DIABLO<sup>57</sup>, est relarguée de la mitochondrie de façon concomitante au cytochrome *c* (Anguiano-Hernandez et al, 2007). Elle favorise l'activation des caspases en inhibant les IAPs et en s'associant à l'apoptosome. Dans certains systèmes cellulaires, il a été montré que le cytochrome *c* est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire programmée mais non suffisant ; le co-facteur requis pour l'exécution du processus apoptotique était Smac/DIABLO (Du et al, 2000).

### *III.2.2.4 Omi/HtrA2*

Omi/HtrA2 est une sérine protéase requérant sa translocation dans la mitochondrie pour achever sa maturation par clivage protéique. D'un point de vue apoptotique, elle interagit avec XIAP pour favoriser l'activation des caspases. En outre, elle contribue également intrinsèquement au processus de dégradation cellulaire via son activité de protéase.

Plus récemment, la protéine p53 a été montrée comme impliquée à plus d'un titre dans les atteintes de l'intégrité mitochondriale et le contrôle de l'expression de protéines pro-apoptotiques. Mais elle régule également les acteurs moléculaires impliqués dans la voie des récepteurs de mort contrôlant ainsi subtilement l'apoptose comme nous allons le décrire dans le prochain paragraphe

---

<sup>57</sup> Smac/DIABLO : Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP Binding protein with LOw pI

## IV. L'implication de p53 dans la réponse apoptotique

Tout comme la majorité des gènes dont il module la transcription p53 est une protéine qui possède une longue « histoire dans l'Evolution ». La protéine p53 intervient dans la mort cellulaire contrôlée, comme ses orthologues chez la Drosophile (Dmp53) et chez *C.elegans* (Cep-1). Sa fonction la plus conservée est sans doute celle du contrôle de l'apoptose (Slee et al., 2004). Nous allons décrire quels sont ces rôles dans le contrôle l'apoptose (Slee et al., 2004)

### IV.1 Le contrôle par p53 de la voie indépendante des récepteurs de mort (voie mitochondriale)

Lorsqu'on a mis en évidence la signalisation de mort via la voie mitochondriale, il est apparu que Bcl-2 pouvait inhiber l'arrêt du cycle et l'apoptose induite par p53 (Ryan et al., 1994). En effet, les gènes codant pour les régulateurs de la réponse apoptotique mitochondriale sont quasiment tous sous le contrôle de p53. Ainsi, *bax*, *bak*, *apaf-1*, *mcl-1* sont sous la dépendance d'une activation séquentielle de p53 (**figure 25**). De plus, cette dernière régule l'expression de gènes codant pour des protéines proapoptotiques de type « BH3-only », comme Noxa ou PUMA (Vousden K. H., 2005), ayant pour fonction d'inhiber les protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-2.

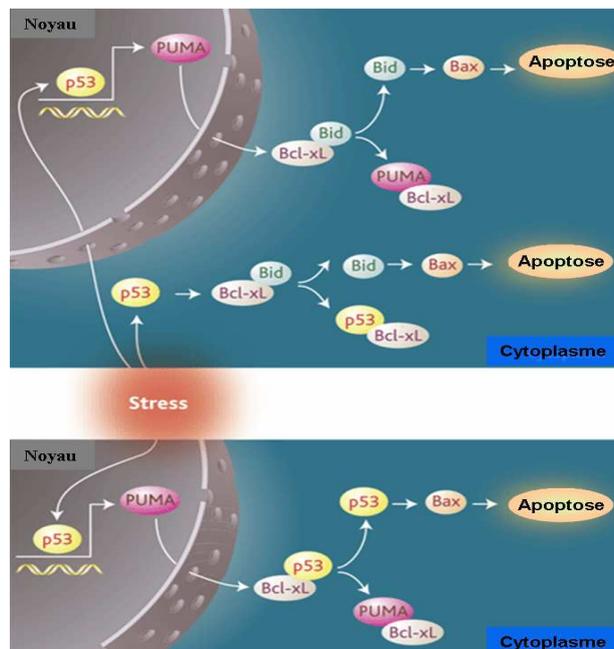


Figure 25 : Modèles généraux décrivant les principales activités pro-apoptotiques de p53.

(D'après Vousden K. H., 2005)

### IV.1.1 Inhibition des protéines anti-apoptotiques

La protéine p53 peut être considérée comme une protéine BH3-only (Sansome et al., 2001 ; Koumenis et al., 2001). En effet, dans l'apoptose induite par les dommages à l'ADN, la dérégulation d'oncogènes ou l'hypoxie, la stabilisation de p53 sera rapidement suivie d'une translocation d'une fraction cytosolique de la protéine vers la mitochondrie (Park et al., 2005 ; Hammond et al., 2005 ; Erster et al., 2004). Les protéines anti-apoptotiques cibles sont Bcl-x<sub>L</sub> et Bcl-2. En interagissant avec elles, p53 va libérer les protéines pro-apoptotiques qui y sont liées telles que Bax, Bak, Apaf-1 ou potentiellement t-Bid (**figure 25**). Des analyses de structures ont confirmé que le domaine de liaison à l'ADN de p53 et le domaine BH4 de Bcl-x<sub>L</sub> étaient effectivement impliqués dans cette interaction. Il semble également, que la mono-ubiquitinylation de p53 par MDM2 entraînant sa séquestration cytoplasmique, faciliterait la relocalisation mitochondriale de p53.

### IV.1.2 Activation des protéines pro-apoptotiques

D'autres travaux, suggèrent que l'interaction directe entre Bax et p53 entraînerait son activation. C'est en tant que protéine chaperonne, que la fraction cytosolique de p53 (c'est-à-dire ni mitochondriale ni nucléaire), prendrait en charge Bax (Häcker et al., 2007) en l'amenant à la mitochondrie, favorisant ainsi son homodimérisation, la perméabilisation de la membrane externe, la libération du cytochrome *c* et l'apoptose. Un modèle avec PUMA (Fuster et al., 2007 ; Chipuk et al., 2005), a été proposé pour expliquer la rapidité de la mort induite par p53. Dans les cellules normales, p53 est trop faiblement exprimée pour induire la transcription *de novo* de PUMA et reste inhibée de par sa liaison à Bcl-x<sub>L</sub>. Lorsque la cellule subit un stress dont des dommages à l'ADN ou une activation oncogénique, p53 s'accumule et initie la transcription de PUMA. En retour, cette dernière se lie à Bcl-x<sub>L</sub>, libérant p53 qui pourra complexer Bax et activer son oligomérisation.

En conclusion, il existe actuellement plusieurs hypothèses concernant le(s) rôle(s) de p53 dans l'apoptose (**figure 26**). Tout d'abord, directement, via l'interaction et leur inhibition rapide avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, entraînant une première perméabilisation de la membrane mitochondriale. Puis, indirectement, en activant et favorisant l'action de protéines pro-apoptotiques comme Bax/Bak. p53 représente, à la fois dans ce modèle, un intégrateur sensible du signal, mais aussi un effecteur rapide de mort de cellules potentiellement

endommagées ou sénescents et inaptes à développer une adaptation aux conditions hypoxiques. Enfin, p53 représente aussi un activateur, qui induit une mort irréversible lorsque la situation ne permet plus aux cellules une survie adéquate.

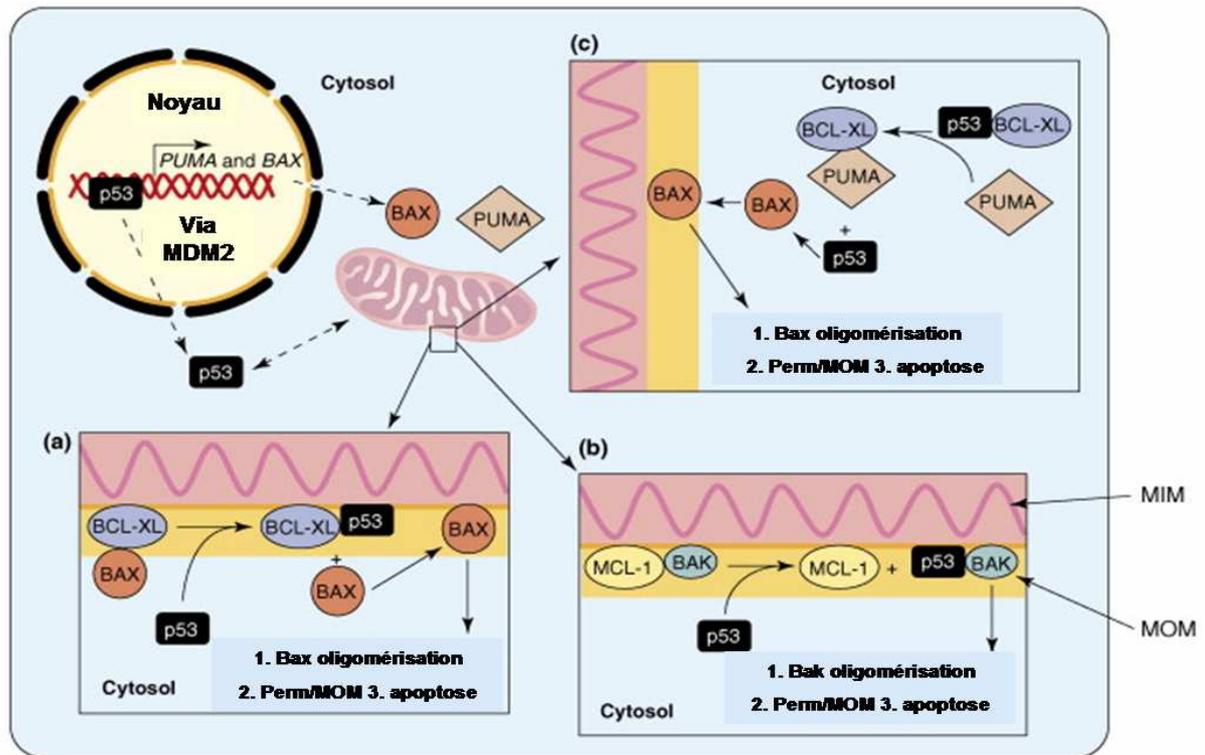


Figure 26: Activité mitochondriale et cytosolique pro-apoptotique de p53.

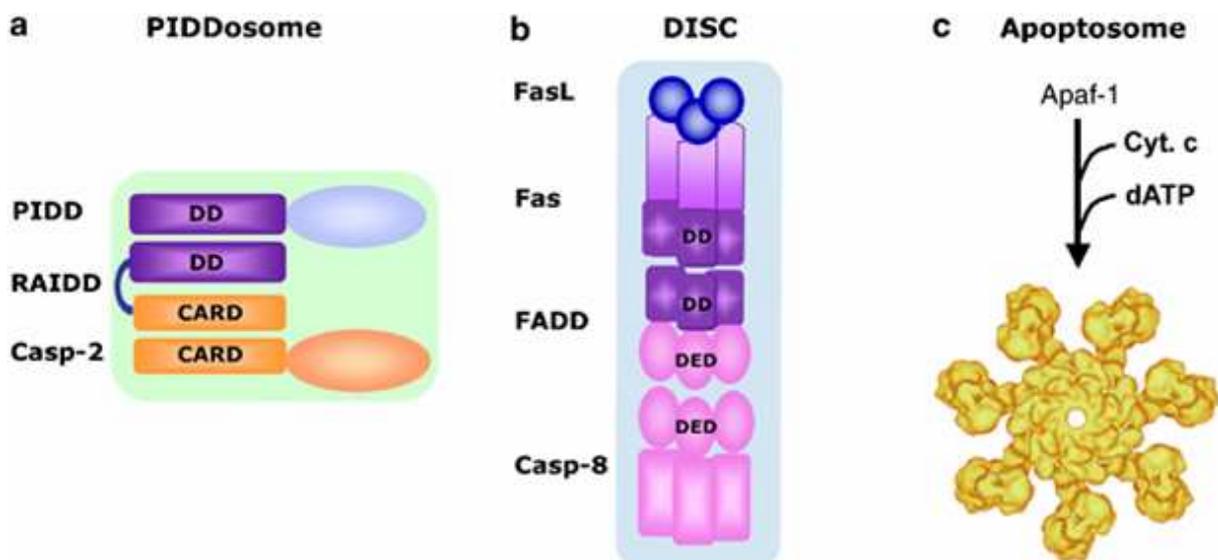
Suite à un stress, p53 peut interagir avec Bcl-xL pour libérer Bax (a) et avec Mcl-1 pour libérer et relocaliser Bak (b) à la membrane mitochondriale externe (MOM). Lorsque l'accumulation cellulaire de p53 devient suffisante, celle-ci peut initier la transcription de ses gènes cibles comme PUMA. Celui-ci ira à son tour interagir avec Bcl-xL et inhiber son interaction avec la fraction cytosolique de p53 (c). Cette dernière pourra alors transcrire et activer Bax et l'apoptose. MIM : Membrane mitochondriale interne, Perm/MOM : perméabilisation de la MOM.

(Adapté d'après Fuster et al, 2007)

## IV.2 p53 et le contrôle de la voie des récepteurs de mort

Durant la première décennie de la découverte du contrôle de la mort cellulaire par p53, la voie dépendante des récepteurs de mort ne semblait pas impliquer p53. Une seule étude (Bennett et al., 1998), suggère que p53 interviendrait dans cette voie, indépendamment de son activité transcriptionnelle. Selon ces auteurs, p53 pourrait réguler Fas de façon indépendante de la transcription de son gène en remplissant une fonction de protéine chaperonne en prenant en charge Fas, et en le redistribuant à la membrane favorisant également la liaison entre Fas et FADD. Ceci ayant pour conséquence de sensibiliser la cellule à l'apoptose. En revanche, p53

serait impliquée dans cette voie de mort, via son activité transcriptionnelle. Elle pourrait promouvoir la mort cellulaire en activant la transcription de gènes codant pour des récepteurs de mort tels que Fas/Apo-1, DR5/KILLER, DR4. Sans que l'on explique le recrutement de p53 par ces récepteurs, cette dernière augmenterait la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par TRAIL. Un autre gène de la voie extrinsèque, PIDD<sup>58</sup> (Berube et al., 2005), serait activé par p53. Il servirait de médiateur dans l'élaboration de la réponse apoptotique via p53. Après fixation de PIDD via son domaine de mort (Death Domain : DD), homologue à celui de la protéine adaptatrice RAIDD (équivalente à TRADD), celle-ci activerait la caspase-2 (équivalent de la caspase-8). Cette dernière pouvant à son tour activer les caspases d'aval (caspases-3 et -7). Par analogie avec l'apoptosome, le complexe multi-protéique composé par la procaspase-9, Apaf-1 et le cytochrome *c*, décrit dans la voie intrinsèque, le complexe protéique formé par la procaspase-2, PIDD et RAIDD a été nommé : « le piddosome » (**figure 27**). De plus, la caspase-2 peut, outre l'activation de la caspase-3, cliver Bid et activer la voie mitochondriale. Ainsi, le « piddosome » serait composé de plusieurs protéines homologues à celle constituant le DISC et serait un complexe protéine cytoplasmique comme l'apoptosome.



**Figure 27 : Les complexes multiprotéiques de la mort cellulaire.**

Le piddosome (a) est représenté, ainsi que le complexe DISC (b) et l'apoptosome (c)

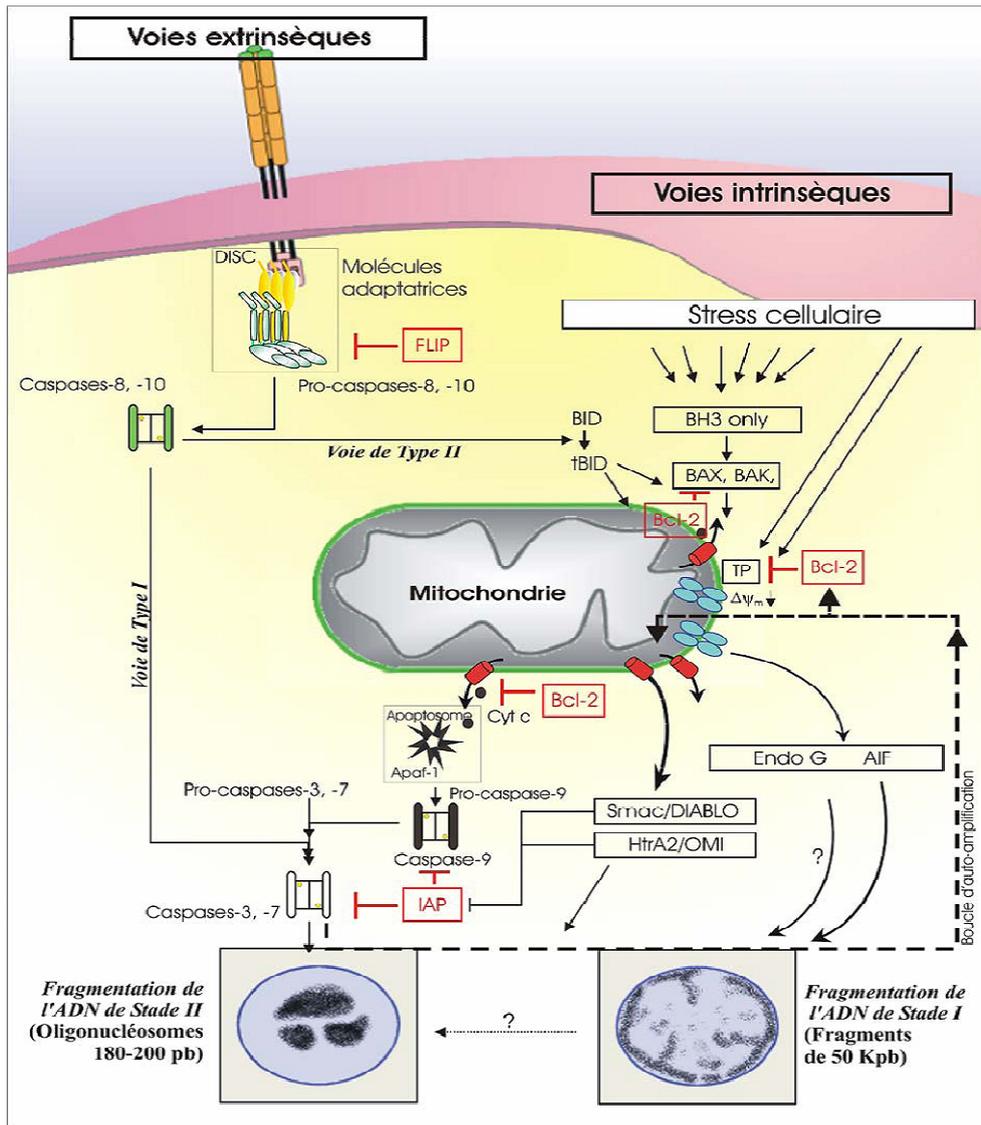
(Adapté de Bao et al, 2007)

<sup>58</sup> PIDD : p53-Induced protein with a Death Domain

En conclusion, il existe actuellement plusieurs hypothèses concernant le(s) rôle(s) de p53 dans l'apoptose. Tout d'abord, directement, via l'interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL, provoquant leur inhibition rapide et ayant pour conséquence la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Puis, indirectement, en activant et en favorisant l'action de protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bak. Ainsi, p53, représente, à la fois dans ce modèle, un intégrateur sensible du signal, mais aussi, un effecteur rapide de mort de cellules potentiellement endommagées ou sénescents et incapables à développer une adaptation aux conditions hypoxiques. Enfin, p53 représente aussi un activateur transcriptionnel, qui induit une mort irréversible lorsque la situation ne permet plus aux cellules une survie optimale.

## **V. Interconnexions des voies de mort dépendantes ou indépendantes des récepteurs de mort**

La régulation étroite du processus de mort est indispensable à l'élaboration d'une réponse de mort adéquate. La cellule pourra effectuer éventuellement des étapes de réparation ou procéder à la mise en place d'un métabolisme adaptatif. Toutefois, lors d'un programme de mort activé au cours du développement ou de stress drastiques, la mort cellulaire doit être rapidement initiée et massive. Il existe des acteurs moléculaires favorisant l'interconnexion entre les deux voies majeures de l'apoptose (**figure 28**). C'est, par exemple, le cas de la forme tronquée de Bid (tBid) qui peut interagir avec Bcl-x<sub>L</sub> et former une boucle d'amplification du signal apoptotique provenant d'une activation de la voie des récepteurs de mort. Ces protéines « BH3-only » peuvent être considérées, comme des émissaires de mort dont l'activation est consécutive à différents stress cellulaires. Il a été également démontré que la caspase-3 pourrait activer, en retour, la caspase-8, sans recrutement de molécules de la voie des récepteurs de mort (Wieder et al., 2001).



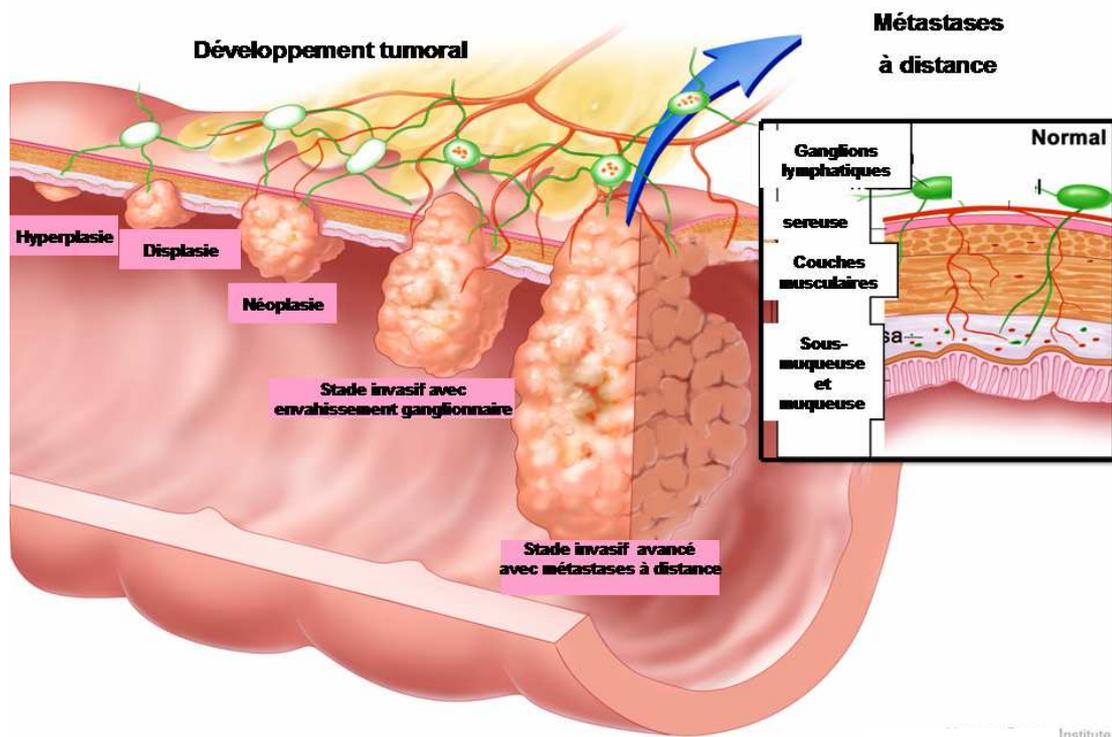
**Figure 28 : Résumé des voies apoptotiques indépendantes des récepteurs de mort et leurs interconnexions avec la voie des récepteurs de mort.**

(D'après Marchetti P., 2005)

Dans la **partie III** suivante, nous allons présenter le phénomène d'hypoxie tumorale ainsi que les mécanismes mis en place par les cellules cancéreuses, leur permettant de survivre et d'échapper à l'apoptose dans ces conditions. Enfin, nous verrons l'importance de p53 au cours de l'élaboration de la réponse cellulaire à cette hypoxie.

## PARTIE III : Hypoxie et implications de p53 dans l'élaboration de la réponse cellulaire adaptative

En anatomie pathologique humaine, la formation et l'évolution d'une tumeur sont divisées en plusieurs étapes. Ces modifications visibles successives au niveau tissulaire (**figure 29**) sont corrélées avec les étapes de transformations cellulaires énoncées plus haut. En prenant l'exemple d'un épithélioma (type de carcinome cutané), on peut définir plusieurs stades anatomopathologiques séquentiels au cours de son développement. Tout d'abord, un stade qualifié d'*hyperplasie*, où la prolifération excessive de cellules, gardant une morphologie et des rapports normaux (inhibition de contact, signalisation paracrine...), entraîne une augmentation d'épaisseur de l'épithélium. Puis, le stade suivant est qualifié de *dysplasique*. En son sein, les cellules proliférantes commencent à présenter des anomalies morphologiques telles que des pertes focales de la polarité cellulaire, de la cohésion intercellulaire. Puis apparaît un stade dît de *néoplasie in situ*, dans lequel les cellules présentent des anomalies nucléo-cytoplasmiques marquées, une désorganisation architecturale significative mais sans franchissement de la membrane basale. Au stade plus évolué, le cancer devint invasif, les cellules transformées franchissent la lame basale, pénètrent en profondeur le chorion de la muqueuse, puis envahissent les structures avoisinantes. Outre les enzymes protéolytiques déjà énoncées plus haut (métalloprotéases matricielles, collagénases), les cellules tumorales doivent développer des propriétés de néo-angiogenèse pour assurer l'oxygénation de la masse tumorale, dès que celle-ci dépasse 2 mm<sup>3</sup>. Cette vascularisation étant imparfaite, des zones d'hypoxie vont apparaître, entraînant l'apparition d'une pression de sélection, qui aboutira à l'apparition de cellules tumorales plus agressives, plus prolifératives, plus résistantes et plus invasives.



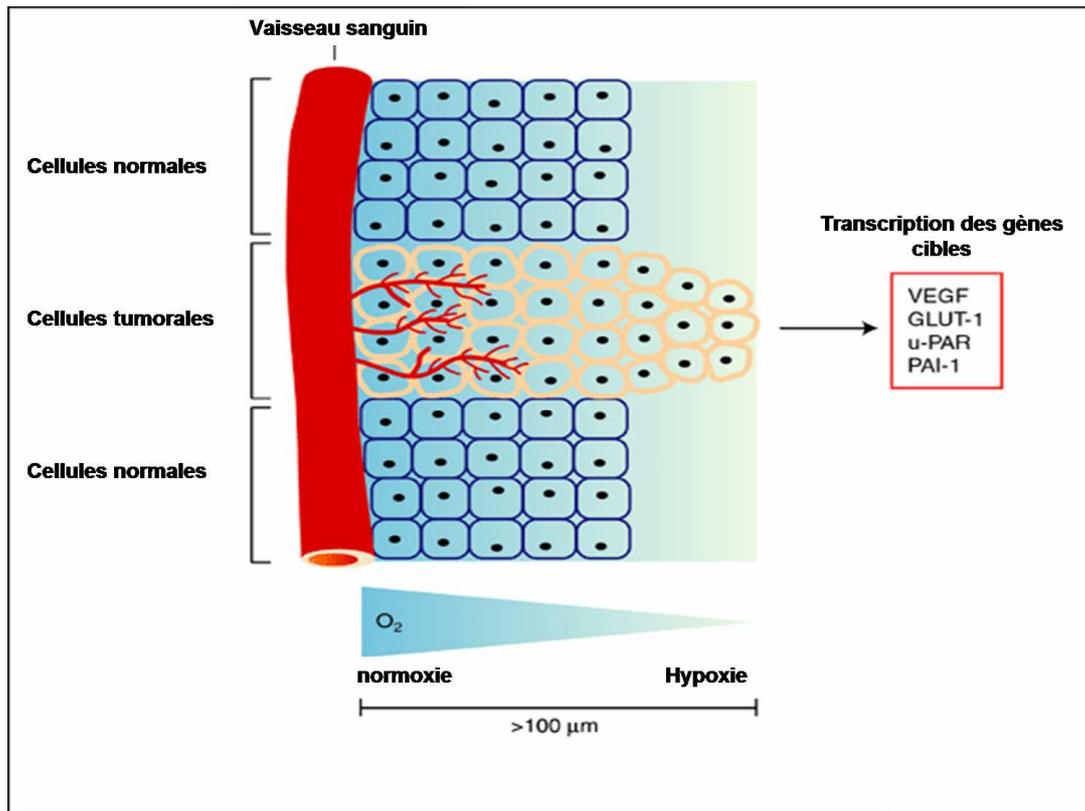
**Figure 29 : Les différents stades de développement d'une tumeur.**

De l'hyperplasie initiale à l'envahissement ganglionnaire puis à distance par des métastases

(Modifié, document NIH)

De part leur croissance extrême, les tumeurs solides présentent presque toujours des zones dans lesquelles la teneur en oxygène est significativement plus basse (**figure 30**) que dans les tissus avoisinants (Greco et al, 2007). Cette hypoxie (voire anoxie pour les zones les plus centrales de la tumeur) peut entraîner la mort par nécrose de cellules. Néanmoins, une partie d'entre elles arrivent à survivre en développant une physiologie particulière et exprimant un groupe de gènes spécifiques via un facteur de transcription inductible par l'hypoxie : HIF-1<sup>59</sup>, qui joue un rôle central dans ces voies de signalisation. Cependant, cette adaptation entraîne également l'apparition d'un phénotype cellulaire plus agressif et résistant (Wilson G. D, 2007).

<sup>59</sup> HIF-1 : Hypoxia-Inductible Factor-1



**Figure 30 : Développement de zones hypoxiques lors de la croissance tumorale.**

Les cellules qui survivent, présentent un profil d'expression génétique particulier les rendant plus prolifératives et invasives.

(Modifié, Carroll V. C. et Ashcroft M, 2005)

## **I. Hypoxie : causes, signalisation et effets sur la survie des cellules cancéreuses et la progression tumorale**

### **I.1 Les causes de l'hypoxie**

#### **I.1.1 L'hypoxie physiologique**

L'hypoxie est un phénomène naturel, indispensable lors de l'implantation de l'embryon dans la cavité utérine, au bon développement du placenta, ainsi qu'au déroulement correct de l'embryogenèse (Yin et al, 2002). L'activation du développement de nouveaux vaisseaux autour de l'embryon est déclenchée par les voies de signalisation hypoxique. L'hypoxie est également induite lors de la phase « préparatoire » de l'accouchement. En effet, l'ocytocine est une hormone qui va être sécrétée afin d'anesthésier les neurones fœtaux

afin que ceux-ci soient prêts à affronter le traumatisme et/ou le manque d'oxygène inhérents à la naissance (Tyzio et al., 2006).

Comme le démontre des études sur des souris invalidé pour HIF-1 (Hypoxia-Inductible Factor-1), les voies de signalisations hypoxiques sont impliqués dans la formation du tube neural, de la vésicule vitelline, du placenta. La mise en place des réseaux vasculaires est également sous la dépendance des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 (Ramirez-Bergeron et al, 2006). Dans le cas des cellules souches, souvent localisées dans des zones hypoxiques (moelle osseuse, gyrus denté de l'hippocampe...), le facteur de transcription HIF-1 permet, via l'expression conditionnelle de gènes, le maintien de leur phénotype pluripotent et l'induction d'un métabolisme glycolytique anaérobique efficace permettant leur survie (Okazaki et al, 2006).

### I.1.2 L'hypoxie pathologique

Le stress hypoxique est également retrouvé au cours de conditions physiopathologiques tels que les ischémies (Brahimi-Horn et al, 2007), les infarctus du myocarde (Okuda M, 2006) ou les cancers (Martinez-Sanchez et al, 2007). Les tumeurs, de part leur croissance rapide, deviennent souvent hypoxiques. Des études estiment à 100-200  $\mu\text{m}$  la distance d'un vaisseau à laquelle les cellules développent une physiologie hypoxique. Celles n'arrivant pas à s'adapter rapidement meurent par nécrose ou apoptose. Paradoxalement, l'hypoxie cellulaire peut également favoriser la prolifération et augmenter l'agressivité de la tumeur. En effet, les tumeurs présentant de nombreuses zones hypoxiques sont de plus mauvais pronostic (Cecic et al, 2007 ; Wilson G. D, 2007).

Nous allons maintenant décrire les voies de signalisation intracellulaires induites par l'hypoxie et présenter les aspects moléculaires impliqués dans les processus de prolifération, de survie, d'invasion et de résistance provoqués par l'hypoxie.

## I.2 Les voies de signalisations induites par l'hypoxie et leurs conséquences

Pour comprendre les différentes modifications du métabolisme cellulaire dans des tumeurs soumises à un stress hypoxiques nous allons tout d'abord décrire le principal acteur moléculaire de la réponse à la diminution en oxygène. Puis, nous détaillerons les propriétés cellulaires nouvelles qui en découlent.

### I.2.1 HIF-1 : chef d'orchestre de la réponse cellulaire à l'hypoxie

#### I.2.1.1 Structure de HIF1

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : HIF-1 $\alpha$  et ARNT1/HIF-1 $\beta$  (**figure 31**). HIF-1 $\alpha$  et ARNT1 chez l'Homme possèdent respectivement 826 et 789 acides aminés. Ces protéines contiennent des domaines structuraux, tels que bHLH<sup>60</sup> et PAS<sup>61</sup>. Situé à l'extrémité amino-terminale, le motif HLH intervient dans la dimérisation des protéines tandis que la région basique (**b**HLH) qui le précède est impliquée dans la fixation et la spécificité de la liaison de la protéine à l'ADN. PAS correspond au sigle des noms des protéines dans lesquelles ce type de séquences répétées imparfaites a été retrouvé. D'autres domaines fonctionnels de HIF-1 $\alpha$  contribuent également, à assurer sa fonction de régulateur de la transcription de gènes cibles induits par l'hypoxie. Il s'agit tout d'abord des deux domaines de transactivation, se situant au niveau de l'extrémité carboxy-terminale. On trouve le domaine TAD (Trans-Activation Domain) sur HIF-1 $\beta$  qui existe également sur HIF-1 $\alpha$  mais vers le côté N-terminal et donc nommé NAD. La particularité de la sous-unité  $\alpha$  est qu'elle possède un deuxième domaine transactivateur de la transcription situé à l'extrémité C-terminal et nommé CAD. Les domaines NAD et CAD de HIF-1 $\alpha$ , sont séparés par un domaine inhibiteur de la transcription. Il faut noter que le domaine TAD, présent sur la sous-unité  $\beta$ , n'est pas impliqué dans la réponse à l'hypoxie, ce qui souligne encore une fois que HIF-1 $\alpha$  est l'élément clé dans la réponse au stress hypoxique (Dery et al, 2005 ; Zargoska et al, 2004) .

Au sein de la cellule, HIF-1 $\beta$  est exprimé de façon constitutive, seul HIF-1 $\alpha$  est soumis à une régulation négative, en condition de normoxie (voir le paragraphe suivant « Régulation de la stabilité de HIF-1 $\alpha$  »). C'est l'existence d'un domaine protéique

---

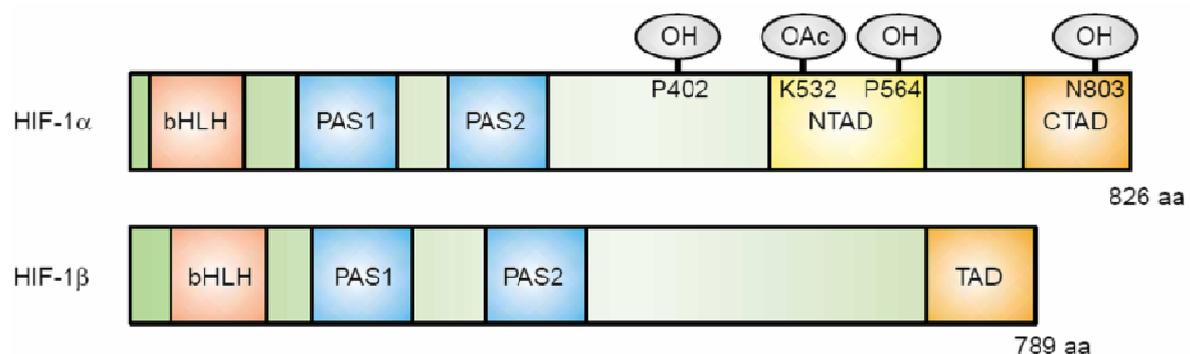
<sup>60</sup> bHLH : basic-Helix Loop Helix

<sup>61</sup> PAS : PER-ARNT-SIM

particulier, le domaine ODD<sup>62</sup> de HIF-1 $\alpha$  qui est responsable de sa dégradation par le protéasome 26S en condition de normoxie.

Enfin, il faut noter la présence de deux séquences de localisation nucléaire, l'une étant située dans le domaine bHLH. Elle est réprimée par le domaine PAS, ce qui entraîne la rétention de la protéine dans le cytoplasme. La seconde séquence est apparentée au NLS<sup>63</sup> retrouvé dans l'antigène T (AgT) du virus simien SV40. C'est cette séquence qui jouerait un rôle crucial dans l'import de HIF-1 $\alpha$  dans le noyau en réponse à l'hypoxie.

D'autres domaines sont présents, permettant l'interaction spécifique de HIF-1 $\alpha$  avec des co-facteurs tels que p300/CBP, HSP-90, pVHL<sup>64</sup>. Ces interactions régulent l'initiation par HIF-1( $\alpha$ + $\beta$ ) de la transcription des gènes possédant un motif HRE<sup>65</sup> au sein de la séquence promotrice. D'autres, comme celle avec pVHL, régule la dégradation de la sous-unité  $\alpha$ .



**Figure 31 : Structure et domaines fonctionnels des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du facteur de transcription HIF-1.**

Les sites d'hydroxylation (OH) sont également représentés.

(Carroll et al., 2005))

<sup>62</sup> ODD : Oxygen-Dependent degradation Domain

<sup>63</sup> NLS : Nuclear Localization Signal

<sup>64</sup> pVHL : protein Von Hippel-Lindau

<sup>65</sup> HRE : Hypoxia Response Element

### *1.2.1.2 Régulation de la stabilité de HIF-1 $\alpha$*

Les mécanismes par lesquels les variations d'oxygène sont détectées au niveau cellulaire sont longtemps demeurés inconnus. En 2002, les équipes de P. J. Rattcliffe et W. G. Kaelin (Ivan et al., 2001), ont publié des données remarquables sur la régulation de l'activité de HIF-1. Le mécanisme semblerait impliquer des réactions d'hydroxylation dépendante de la présence de fer et d'oxygène (**Figure 32**). Les « senseurs » d'oxygène au niveau tissulaire ont été caractérisés comme étant des prolyl-hydroxylase (PHD). En condition de normoxie, ces enzymes ajoutent un groupement hydroxyle au niveau des prolines 402 et 564, ce qui aura pour effet la formation de liaisons hydrogène avec pVHL. Celles-ci entraînent la polyubiquitination de HIF-1 $\alpha$  et sa rapide dégradation par le protéasome.

La diminution du taux d'oxygène, empêche l'hydroxylation des prolines de HIF-1 $\alpha$  et permet sa stabilisation. Une fois stabilisé, HIF-1 $\alpha$  est transporté dans le noyau, où il va interagir avec la sous-unité  $\beta$  (qui est exclusivement nucléaire) pour former le facteur de transcription HIF-1 fonctionnel. L'hétérodimère se fixe, alors sur les séquences HRE des gènes sensibles à l'hypoxie et initie la transcription de ces derniers. Plusieurs co-activateurs peuvent se joindre à HIF-1 pour affiner et cibler la transcription de gènes particuliers. C'est la cas, par exemple, de p300/CBP<sup>66</sup>, TIF2<sup>67</sup>, SRC-1<sup>68</sup>(Carrero et al, 2000).

Un partenaire cellulaire important et fréquent de HIF-1 $\alpha$  est la protéine p53 (Sano et al, 2007 ; Fels et al, 2005). Celle-ci interagit dans de nombreuses voies de transduction du signal et de mort cellulaire en réponse à de nombreux stress, notamment hypoxique et anoxique. Récemment, des travaux suggèrent que p53 par l'intermédiaire de MDM2, régule également la dégradation de HIF-1 $\alpha$ .

---

<sup>66</sup> CBP : CREB-Binding Protein

<sup>67</sup> TIF2 : Transcription Intermediary Factor 2

<sup>68</sup> SRC-1 : Steroid Receptor Co-activators

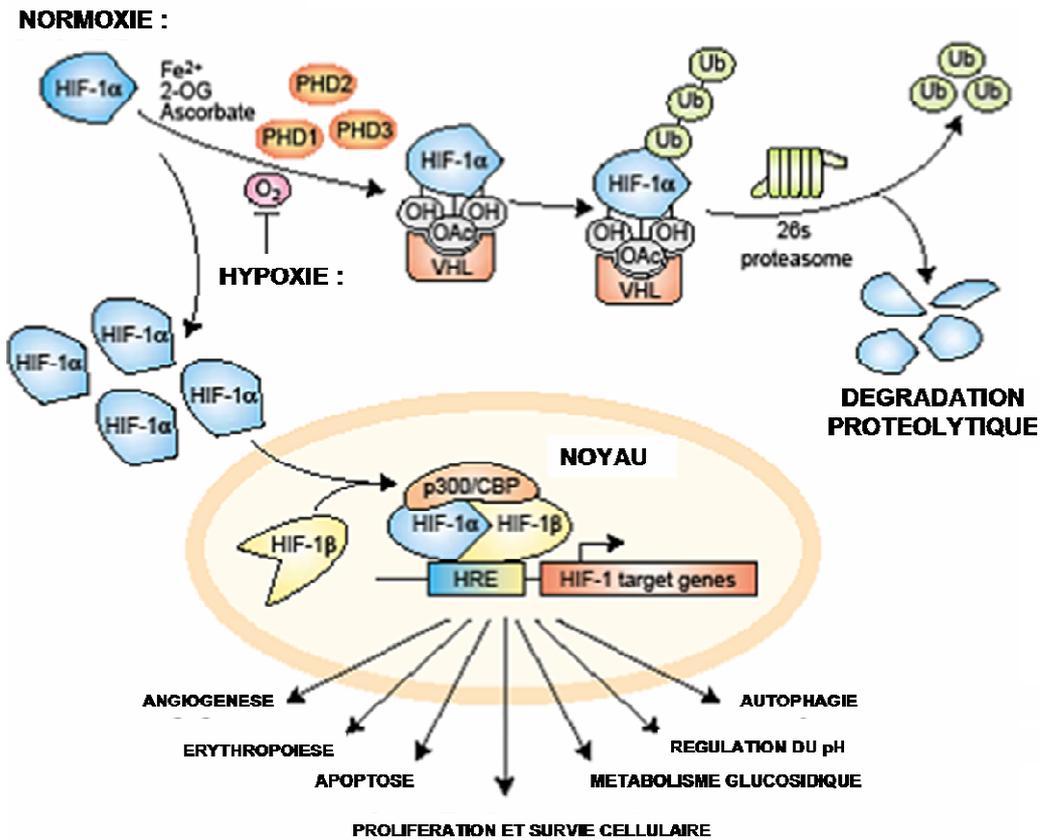


Figure 32 : Mécanismes de dégradation de HIF-1 $\alpha$  en normoxie et sa stabilisation en conditions hypoxiques. HIF-1 active la transcription de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires. (Caroll et al., 2005)

### I.2.2 Effets sur la survie des cellules cancéreuses et la progression tumorale

Plus de 60 gènes ont été décrits comme étant des cibles directes du facteur de transcription HIF-1 (Brahimi-Horn et al, 2007). Ces gènes codent pour des protéines impliquées et/ou contrôlant de nombreux processus cellulaires. Nous pouvons citer le métabolisme énergétique, le métabolisme des acides aminés, la traduction des protéines, la mobilité cellulaire... Aussi ici, nous nous limiterons à des aspects directement impliqués dans la survie des cellules cancéreuses et leur prolifération, leur agressivité, leur capacité à développer des métastases et leur résistance.

### *1.2.2.1 HIF-1 dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses*

En condition de stress hypoxique, au sein de la masse tumorale, les cellules cancéreuses survivent grâce à l'induction par HIF-1, de nombreux gènes codant pour des enzymes de la voie glycolytique (transporteur membranaire de glucose, glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, hexokinase 1 et 2, phosphofructokinase...). Ces enzymes permettent un basculement vers le métabolisme anaérobie et la production d'énergie. De plus, nous avons vu plus haut que les cellules oncogéniques présentent très souvent une autocrinie non physiologique. Or, il a été montré dans des travaux récents, que HIF-1 $\alpha$  pouvait être stabilisée par d'autres stimulus que l'hypoxie, tels que, l'insuline (IGF 1 et 2), l'EGF (Epidermal Growth Factor), sont capables d'augmenter le niveau de ce facteur de transcription. Ainsi, en assurant sa synthèse d'énergie par glycolyse et en stimulant de façon indépendante la stabilisation de HIF-1, les cellules cancéreuses se donnent les moyens d'échapper à la mort de continuer à proliférer (Tanaka et al, 2006).

Il semble probable qu'HIF-1 intervienne également dans le processus de l'autophagie. En effet, il a été démontré, tout au moins chez la drosophile, que HIF-1 viendrait inhiber une protéine kinase : mTOR<sup>69</sup>. Cette dernière est une protéine kinase, qui via la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction 4EBP1 et de la protéine kinase ribosomale p70 S6, contrôle l'intensité de traduction des ARNm présents dans les cellules. En inhibant mTOR, HIF-1 favoriserait alors l'induction de la macro-autophagie et conférerait aux cellules cancéreuses une survie plus longue (Bohensky et al, 2007).

Enfin, dans des conditions hypoxique, la mort des cellules tumorales peut être également évitée par l'expression accrue de membres anti-apoptotiques de la famille bcl-2. Ainsi, Bcl-xL, et les IAP<sup>70</sup> sont surexprimés, faisant pencher la balance intracellulaire des membres de la famille Bcl-2 vers la survie (Kilic et al, 2007).

### *1.2.2.2 HIF-1 et l'augmentation de l'agressivité des cellules tumorales.*

Par agressivité des cellules cancéreuses, on sous-entend : prolifération accrue et rapide, ainsi que capacité à envahir d'autres zones de l'organisme. En effet, il est maintenant clairement démontré, que l'hypoxie entraînait la dédifférenciation des cellules les mieux adaptées à cet environnement en cellule indifférenciée, présentant de nombreux marqueurs de

---

<sup>69</sup> mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

<sup>70</sup> IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins

cellules souches, « Stem cells-like phenotype ». En activant les voies de signalisation Notch<sup>71</sup> et Oct4<sup>72</sup>, HIF-1 permet aux cellules d'acquies la capacité de se multiplier de manière rapide et autonome. A titre d'exemple, l'induction d'un stress hypoxique sur des lignées de neuroblastome humain, ont montré que, ces cellules possédant des marqueurs neuroendocrines et pseudo-neuronaux, subissaient un processus de dédifférenciation (Edsjö et al, 2007 ; Axelson et al, 2005) et présentaient alors des marqueurs de cellules souches de crêtes neurales qui sont des structures embryonnaires desquels dérivent ces cellules. Cet état de dédifférenciation leur permet également de se développer dans presque tous les tissus dans lesquels elles pourraient métastaser.

Outre cette capacité à auto-entretenir une prolifération soutenue, les cellules cancéreuses présentant une activation élevée de HIF-1, développent également la capacité à créer des métastases en surexprimant des protéases telles que MMP2<sup>73</sup> et uPAR<sup>74</sup> qui digèrent respectivement la matrice extracellulaire et la lame basale (Shyu et al, 2007 ; Luo et al, 2006). Cette production de protéase s'accompagne de l'expression de gènes codant pour un facteur autocrine (Mikami et al, 2005) : l'AMF<sup>75</sup>.

### *1.2.2.3 HIF-1 et la résistance pluri-drogues des cellules cancéreuses.*

Une autre cible directe du facteur de transcription HIF-1 est le gène *mdr1*, codant pour la P-glycoprotéine-170 (Pgp170), transporteur membranaire de 170 kDa, présentant une activité ATPasique accrue dans les cellules hypoxiques et entraînant l'efflux de la majorité des drogues cytotoxiques hydrophobes (Comerford et al, 2002).

En activant ces voies de signalisations « hypoxiques », HIF-1 confère aux cellules cancéreuses, des mécanismes leur permettant d'élaborer des stratégies de survie. Celles-ci profitent aussi, de la combinaison entre plusieurs voies de signalisation (inhibition de l'apoptose et autocrinie, dédifférenciation et capacité d'invasion...) pour survivre et proliférer.

---

<sup>71</sup> Notch : Famille de récepteurs membranaires conservés impliqués dans la différenciation cellulaire

<sup>72</sup> Oct4 : Octamer-binding transcription factor 4

<sup>73</sup> MMP2 : Metalloprotease de type 2

<sup>74</sup> uPAR : urokinase-type Plasminogen-Activator Receptor

<sup>75</sup> AMF : Autocrine Motility Factor

## I.3 Modèles *in vitro* de l'hypoxie

### I.3.1 L'hypoxie physiologique

Dans ce contexte expérimental, les cellules en culture sont placées dans un incubateur maintenu à 37°C mais couplé à un injecteur d'azote qui complexe l'oxygène présent et permet ainsi d'obtenir des conditions de culture présentant une concentration en O<sub>2</sub> diminuée (de l'hypoxie modérée 2% à l'anoxie). Pour obtenir une hypoxie complète il faut mesurer, en plus de la concentration en oxygène gazeux, la teneur en oxygène dissout dans le milieu de culture. Cette méthode d'étude de l'hypoxie cellulaire permet une approche caractérisée par des conditions proches de celle observée *in vivo*.

Cependant, récemment, de nouvelles techniques apparaissent, permettant une modélisation encore plus fidèle des conditions régnant dans une tumeur. Il s'agit par exemple, de cultiver autour d'une matrice des cellules formant ainsi des mini-tumeurs sphéroïdes et reproduisant au centre de celles-ci des conditions d'hypoxie véritables.

### I.3.2 L'hypoxie chimique

L'hypoxie induite chimiquement par des agents mimétiques de l'hypoxie est en fait due à leurs effets sur le métabolisme de HIF-1 $\alpha$ . En fait, ajoutés au milieu de culture, ils stabilisent HIF-1 $\alpha$  en inhibant sa dégradation et placent ainsi la cellule dans une physiologie de type hypoxique alors que la culture se fait en condition de normoxie.

#### I.3.2.1 Le chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>)

Le chlorure de cobalt entraîne la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF-1 en inhibant les enzymes responsables de sa dégradation. Outre l'oxygène, les PHDs nécessitent en co-facteur obligatoire le Fe<sup>2+</sup>. L'ion cobalt (Co<sup>2+</sup>) entre en compétition avec le fer pour l'interaction avec l'enzyme provoquant la perte d'activité enzymatique des PHDs. De plus, le cobalt interfère avec la chaîne de phosphorylation oxydative de la mitochondrie conduisant à une diminution de la synthèse d'ATP, mimant ainsi l'absence d'O<sub>2</sub> lors d'une hypoxie véritable en tant qu'accepteur final d'électrons.

Ceci a pour conséquence la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène, créant un stress oxydatif, entraînant *in fine* des dommages à l'ADN et l'initiation de l'apoptose.

Le cobalt a été montré comme un mimétique de choix de l'hypoxie physiologique puisque, tout comme elle, il stabilise HIF-1 $\alpha$ , provoque une chute de la production d'ATP et induit le même type d'apoptose mitochondriale.

#### *1.3.2.2 Le desferoxamine (DFO ou DFX)*

Le desferoxamine mesylate est une substance utilisée en clinique (Desferal™) dans le traitement de l'hématochromatose, de l'hémosidérose, de la maladie d'Alzheimer ou encore en cas d'intoxication par l'aluminium. C'est un chélateur de fer de haute affinité. Le complexe desferoxamine-Fer entraîne l'inhibition de la dégradation de HIF-1 $\alpha$  et sa stabilisation.

Son avantage par rapport au chlorure de cobalt est que son mécanisme d'action est précisément connu et qu'elle induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Yoon et al., 2002) tout comme l'hypoxie physiologique (Hammond et al., 2002). Elle induit également une mort de type apoptotique impliquant la voie de signalisation intrinsèque.

### **1.3.3 Les limites des modèles *in vitro* de l'hypoxie**

Comme toutes drogues expérimentales, le CoCl<sub>2</sub> et la DFO présentent certains inconvénients dont il faudra toujours tenir compte lors de l'interprétation de résultats expérimentaux.

#### *1.3.3.1 le chlorure de cobalt*

Nous avons vu que le chlorure de cobalt entraîne une diminution de la synthèse d'ATP tout comme l'hypoxie physiologique. Néanmoins, lors d'une étude comparative, il apparaît la diminuer nettement plus que l'hypoxie elle-même. Ceci implique que ce mimétique doit très certainement cibler d'autres voies de la synthèse d'ATP (Karovic et al., 2007).

De plus, CoCl<sub>2</sub> induit la transcription de gènes spécifiques tels que ceux de la protéine de stress HSP72 et de la metallothioneine. Cette dernière, riche en cystéine, est une protéine de détoxification qui protège la cellule d'éléments traces comme le zinc ou le cuivre.

Enfin, CoCl<sub>2</sub> ne provoque pas un arrêt de cycle en G1/S comme l'hypoxie ou la DFO.

### *I.3.3.2 La desferoxamine*

Malgré l'avantage de connaître avec précision son mode d'action, la DFO étant un puissant chélateur de fer, elle peut créer des effets collatéraux en inhibant d'autres enzymes que les PHDs qui dépendent également du fer. On retrouve par exemple dans ce groupe les enzymes de réplication de l'ADN, des enzymes du métabolisme telles que les peroxydases, les catalases ou encore les cytochromes.

Par ailleurs, sa structure chimique pourrait la rendre substrat de pompe d'efflux, telle que la Pgp170, présente à la membrane de nombreuses lignées cancéreuses.

## **II. p53 et hypoxie**

### **II.1 Stabilisation de p53 durant le stress hypoxique**

La protéine p53 est stabilisée sous des conditions d'hypoxie sévère ou prolongée (à partir de 0,02 % O<sub>2</sub>) et durant l'anoxie. En réponse à l'hypoxie, p53 est phosphorylée spécifiquement sur la Ser15 par Chk1/2 suite à leur activation par les kinases ATM/ATR. Cependant et contrairement au stress d'un traitement aux drogues cytotoxiques, d'irradiations ionisantes, p53 stabilisée par l'hypoxie, présente la caractéristique d'être transcriptionnellement inactif (Koumenis et al., 2001). Des études récentes ont montré qu'en réalité, p53 interagissait préférentiellement avec des co-répresseurs de la transcription, comme mSin3A<sup>76</sup> plutôt qu'avec des co-activateurs comme p300 (Koumenis et al., 2001). Ainsi, en conditions hypoxiques p53 est incapable d'induire la transcription *de novo* de *bax*, *p21* et *gadd45*. Néanmoins, il reste capable d'induire l'apoptose via ses fonctions cytoplasmiques en interagissant par exemple avec Bcl-x<sub>L</sub> entraînant la libération du cytochrome *c* et l'activation de la caspase-3. Une conséquence néfaste de cette caractéristique est qu'au sein d'une tumeur, il s'établira une sélection positive de cellules possédant une protéine p53 mutée (ou une kinase ATM/ATR mutée) et qui présentera de ce fait un seuil d'induction de l'apoptose plus élevée.

---

<sup>76</sup> mSin3A : mammalian homologous of yeast Sin3A protein

## II.2 Interaction entre p53 et HIF-1 $\alpha$ durant le stress hypoxique

Contrairement à p53, le facteur de réponse à l'hypoxie, HIF-1 $\alpha$ , est stabilisé dès que la concentration en oxygène commence à diminuer (1 à 2 % O<sub>2</sub>). Lors d'une hypoxie prolongée, HIF-1 $\alpha$  est progressivement dégradé. Grâce à leur cinétique de stabilisation différente (**figure 33**), p53 et HIF-1 $\alpha$  permettent à la cellule d'élaborer une réponse adéquate à ce stimulus (Schmid et al., 2004).

Dans un premier temps, la diminution (même modeste) de l'apport en oxygène, stabilise HIF-1 $\alpha$  qui subit une translocation nucléaire pour interagir avec la sous-unité  $\beta$  et former le facteur de transcription HIF-1 actif. En retour, HIF-1 va venir se lier aux régions promotrices de gènes présentant un motif HRE et impliqués dans la glycolyse, le transport du glucose, la néo-angiogenèse, et induire leur transcription permettant l'adaptation et la survie de la cellule en condition d'hypoxie modérée ou transitoire.

Puis, lorsque l'hypoxie se prolonge, HIF-1 devient moins actif transcriptionnellement et p53 commence à s'accumuler. Il s'installe une compétition entre HIF-1 $\alpha$  et p53 pour l'interaction avec p300. Aux gènes pro-survie, p53 ajoute la transcription de gènes contrôlant l'arrêt du cycle, la réparation des dommages à l'ADN. La balance peut encore à ce moment permettre à la cellule de survivre sans séquelles.

Dans les cas d'hypoxie chronique/sévère ou d'anoxie, HIF-1 $\alpha$  subit une dégradation via MDM2, indépendante des protéines VHL alors que p53 continue à s'accumuler. Cette accumulation massive entraîne sa translocation à la mitochondrie et l'induction de l'apoptose. En outre, p53 peut à ce moment se lier à p300/CBP (au lieu de mSin3A) et induire finalement des gènes tels que *bax* et *bak*, amplifiant ainsi la réponse de mort.

p53 et HIF-1 $\alpha$  peuvent interagir et ceci au niveau du domaine ODD de HIF-1 $\alpha$  et du domaine de liaison à l'ADN de p53 (Chen et al., 2003 ; Fels et al., 2005). Une molécule de HIF-1 $\alpha$  se complexe avec deux monomères de la protéine p53. Des études structurales basées sur des expériences de RMN et de spectroscopie (étude du dichroïsme circulaire dans les UV lointains), ont montré que la nature en structure aléatoire (non repliée) du domaine ODD de HIF-1 $\alpha$  pouvait mimer une double hélice d'ADN et ainsi interagir avec p53 via son domaine de liaison à l'ADN.

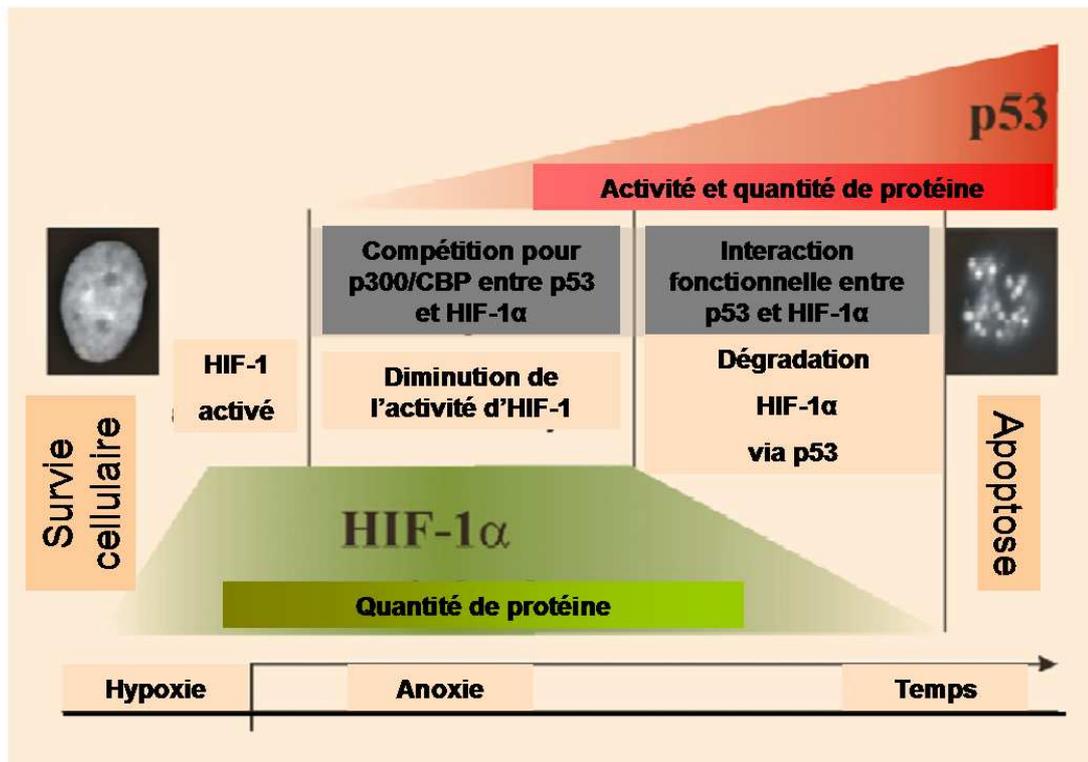


Figure 33 : Modèle décrivant la cinétique inverse d'accumulation de p53 et d'HIF-1 $\alpha$  durant l'hypoxie.

Les interactions entre p53 et HIF-1 $\alpha$  et leurs effets sont aussi mentionnées.

(Modifié à partir de Schmid et al, 2004)

### II.3 Signification biologique de l'interaction p53/HIF-1 $\alpha$

L'accumulation de HIF-1 $\alpha$  est, d'un point de vue cinétique, indépendant de la stabilisation de p53. Néanmoins, au cours d'une hypoxie prolongée ou une anoxie, l'activité transcriptionnelle de HIF-1 va être modulée par p53 via la régulation négative de HIF-1 $\alpha$ . D'abord, par l'intermédiaire d'une compétition pour l'accessibilité à des co-activateurs de la transcription puis par dégradation de la sous-unité  $\alpha$  (Schmid et al., 2004). Pour certains auteurs, cette dégradation de la sous-unité  $\alpha$  va impliquer un troisième acteur moléculaire : MDM2. En effet, HIF-1 $\alpha$  interagirait directement avec p53, lors de la régulation de la transcription mais nécessiterait une interaction intermédiaire avec MDM2 (Chen et al., 2003) pour contrôler la dégradation de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome.

La compréhension des mécanismes initiateurs et des conséquences de cette interaction pourraient très probablement ouvrir la voie à des recherches sur de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, lorsque des tumeurs, possédant une copie sauvage de p53, sont traitées par des agents génotoxiques ou par des radiations, ceci va entraîner une accumulation de p53 qui sera indépendante de la concentration en O<sub>2</sub>. En conséquence, nous aurons au sein

de ces tumeurs une dégradation d'HIF-1 $\alpha$  dépendante de p53-MDM2 et diminution de l'angiogénèse, affaiblissant ainsi la progression tumorale.

### **III. La régulation par p53 de l'apoptose induite par un stress hypoxique**

Un stress hypoxique est accompagné d'une acidose et s'il est prolongé dans le temps, de dommages à l'ADN. C'est ce stress multiparamétriques que p53 devra intégrer pour élaborer une réponse physiologique adéquate.

#### **III.1 La détection**

Les dommages à l'ADN ainsi que l'arrêt de la réplication provoqués par l'hypoxie vont être détectés par le système de kinases ATM/ATR qui vont, en retour, activer par phosphorylation, les kinases Chk1/Chk2. Outre le fait d'inhiber cdc25A, ces kinases secondaires vont phosphoryler p53 sur la sérine 15 et 20. Ceci a pour effet immédiat de dissocier l'interaction MDM2/p53 et de stabiliser p53 entraînant son accumulation dans la cellule.

#### **III.2 Bilan de la distribution de p53 dans les compartiments cellulaires**

##### **III.2.1 La mitochondrie**

Lors de la réponse adaptative à l'hypoxie, on retrouve lors d'un stress prolongé, la translocation de p53 à la mitochondrie, interagissant avec Bcl-2 et Bcl-xL (Park et al., 2005 ; Erster et al., 2004)). Néanmoins, il reste à caractériser si cette interaction intéresse la forme non phosphorylée de p53 ou si la phosphorylation sur des résidus spécifiques (comme la Ser15) sont essentielles à sa translocation mitochondriale.

##### **III.2.2. Le noyau**

Il est connu que la protéine p53, malgré sa relocalisation nucléaire, stabilisée sous conditions hypoxiques, était incapable d'induire la transcription de gènes habituellement sous son contrôle et notamment ceux impliqués dans l'apoptose (*bax*, *gadd45*, *p21*...). En fait,

dans une cellule portant une copie sauvage de *TP53*, soumise à un stress hypoxique, la transcription induite par p53 est en réalité décalée dans le temps afin de permettre à la cellule d'essayer de s'adapter via l'expression de gènes modulée par HIF-1 (Speidel et al., 2006). Si elle échoue (ou si le stress est trop drastique), p53 sera déplacé des co-répresseurs de la transcription par les co-activateurs comme p300, libérés de leur interaction avec HIF-1 $\alpha$  après à sa dégradation.

### III.2.3 Le cytoplasme

Une fois Bax/Bak transcrit, la fraction de p53 cytoplasmique (phosphorylé sur des résidus spécifiques) va interagir avec ces derniers afin de les activer et de les transporter à la mitochondrie.

## **RESULTATS**

Nous avons dans notre travail, validé l'implication « mitochondriale » et « nucléaire » de p53 lorsque des cellules de neuroblastome humains étaient soumises à un stress de type hypoxique en ajoutant au milieu de culture du chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>).

En même temps, nos résultats expérimentaux ont également levé d'autres interrogations concernant les voies de signalisations ainsi que les phosphorylations permettant à p53 de contrôler la mort cellulaire. En caractérisant ces états de phosphorylations, ainsi que la redistribution intracellulaire de p53, nous avons pu établir la cinétique d'activation de p53 suite à un stress induit par le cobalt (Chapitre I)

Ensuite et afin de préciser encore un peu plus l'implication de p53 dans cette problématique, nous avons voulu caractériser les conséquences de l'extinction de son expression par une méthode d'ARN interférence (ARNi) dans une lignée portant un allèle sauvage du gène *TP53* (chapitre II).

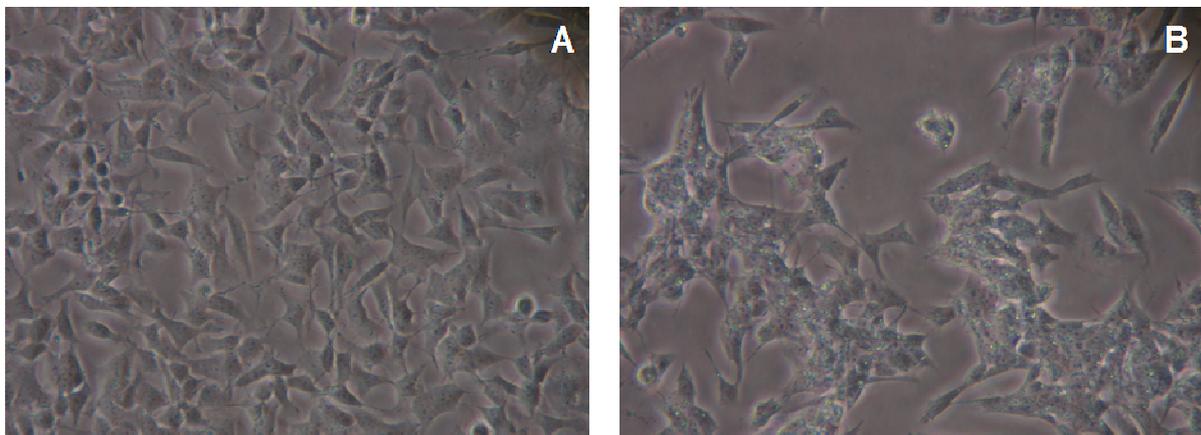
Enfin, l'utilisation d'un autre mimétique de l'hypoxie *in vitro*, la desferoxamine (DFO), nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires, illustrant des mécanismes moléculaires apoptotiques alternatifs à ceux initiés par l'exposition au CoCl<sub>2</sub> (chapitre III).

### **Le modèle cellulaire :**

Notre travail d'investigation des mécanismes de mort cellulaire programmée, a été basé sur un modèle de lignées de neuroblastome humain. Il s'agit d'une tumeur solide se développant à son origine *in utero* à partir de cellules des crêtes neurales qui donnent, entre autres, naissance au système nerveux sympathique au cours de l'embryogenèse. Le neuroblastome peut se développer à partir d'une quelconque partie du système nerveux sympathique, le plus souvent au niveau abdominal (glandes médullo-surrénale). Lorsqu'il se propage, les sites métastatiques les plus fréquents sont l'os la moelle osseuse, le foie et la peau. Les lignées utilisées au cours de ce travail de recherche sont issues de métastases situées au niveau de la moelle osseuse.

- La lignée *SHSY5Y* est une lignée faiblement différenciée (**figure 34A**) mais présentant en culture une population cellulaire présentant des marqueurs de différenciation de cellules neuroendocrines, tels que NPY (NeuroPeptide Tyrosine), la chromogranine et une synthèse accrue de tyrosine hydroxylase. Cette dernière entre en jeu dans la biosynthèse des catécholamines. Elle possède un génotype sauvage pour le gène *TP53* et n'exprime pas de protéines de résistance aux drogues de type Pgp170.

- La lignée *SKNBE(2c)* est plus homogène et est composée de cellules neuroblastiques non différenciées (**figure 34B**). Elle possède une mutation sur le gène codant pour p53 au niveau du codon 135 ayant pour conséquence le remplacement d'une cystéine par une phénylalanine au niveau de la protéine. Ce codon est situé dans le domaine de liaison à l'ADN de p53. Il est important de noter que cette lignée est issue d'un patient ayant subi des traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. Néanmoins, nous n'avons pu détecter la présence d'une pompe membranaire de type Pgp170, mais la présence d'un membre de la famille des protéines MRP est tout à fait envisageable.



**Figure 34: Cultures de lignées de neuroblastome humains.**

Les cellules de la lignée *SHSY5Y* (A) et *SKNBE(2c)* (B) en conditions de culture standards

# **Chapitre I : Caractérisation des effets apoptogènes du $\text{CoCl}_2$ dans des lignées de neuroblastome humains : cinétique d'action et régulation de p53**

## **I. Article I : Implication de p53 dans la réponse apoptotique induite par le chlorure de cobalt**

La première partie des résultats concerne la caractérisation de la signalisation de mort impliquée dans l'apoptose des deux lignées de neuroblastome humain *SHSY5Y* et *SKNBE(2c)* lors d'un stress de type hypoxique.

D'abord, le test de cytotoxicité du chlorure de cobalt sur les deux lignées, montre une sensibilité commune à l'action du cobalt, mais elles présentent cependant, une cinétique différente dans la baisse de la viabilité. En effet, les cellules de la lignée *SKNBE(2c)* semblent plus « résistantes » au déclenchement du signal de mort cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé le type de mort cellulaire activé dans ces lignées suite à l'exposition à cet agent mimétique de l'hypoxie. Tout d'abord nous avons vérifié l'établissement d'une « physiologie cellulaire de type hypoxique » dans les cellules, en analysant l'effet du traitement sur la stabilisation HIF-1 $\alpha$ . Dans les cellules *SHSY5Y*, le  $\text{CoCl}_2$  provoque effectivement une stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  de HIF-1 et sa translocation dans le noyau. De façon inattendue, nous avons détecté dans la lignée *SKNBE(2c)*, une stabilisation « constitutive » de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules contrôles, aussi bien que dans les cellules traitées, ainsi que sa localisation nucléaire. Avant d'étudier la signalisation de mort, nous avons procédé à deux vérifications. Tout d'abord, la lignée *SKNBE(2c)* étant décrite pour porter une protéine p53 transcriptionnellement inactive (Tweddle et al., 2001), en raison d'une mutation ponctuelle au niveau du codon 135, nous avons effectué un séquençage d'un fragment d'ADN génomique. Pour ce faire, nous avons amplifié par PCR, puis séquencé, une région encadrant ce codon dans l'exon 5. Comme attendu, la séquence retrouvée dans les cellules *SHSY5Y* était de type sauvage alors que, les cellules de la lignée *SKNBE(2c)* présentaient la mutation.

L'observation morphologique du corps cellulaire et du noyau (par un marquage au réactif Hoechst 3342) suggérait une mort de type apoptotique. En effet, la condensation et la marginalisation de la chromatine (en « roue de charrette ») ainsi que le rétrécissement des corps cellulaire avec une structure arrondie mais intacte, sont des changements typiques de l'apoptose.

Durant la cinétique de traitement au  $\text{CoCl}_2$ , nous avons pu séquentiellement détecter une chute du potentiel membranaire mitochondrial (plus tardif dans la lignée *SKNBE(2c)*), une accumulation progressive de la protéine pro-apoptotique Bax- $\alpha$  et PUMA (sauf dans la lignée *SKNBE(2c)*), ainsi qu'une activation concomitante de la caspase-3.

Ces résultats étaient compatibles avec une potentielle implication de p53 en amont. Ces deux lignées différant par leur statut du gène *TP53*, nous avons donc voulu caractériser l'évolution de la protéine p53 au cours de l'exposition des neuroblastomes à un stress hypoxique. Dans les cellules *SHSY5Y*, portant un allèle sauvage du gène *TP53*, une accumulation progressive de la protéine fut observée dans les temps précoces de traitement. Puis, lorsque la mort est induite de manière significative, le niveau de p53 diminue inversement et proportionnellement à l'accumulation de la protéine Bax. Dans la lignée *SKNBE(2c)*, mutée pour le gène codant pour p53, nous détectons dans les cellules non traitées une quantité importante de protéine p53. Ce résultat est en accord avec d'autres travaux (Tweddle et al., 2001) mettant en avant la présence intrinsèque importante de p53 au sein de cette lignée. Lorsque ces cellules sont traitées avec le  $\text{CoCl}_2$ , le niveau de p53 diminue significativement dès deux heures de traitement.

Nous avons décrit dans la **partie I**, que les fonctions biologiques de p53 étaient largement régulées par des étapes de phosphorylation sur des résidus spécifiques. L'évolution différente du niveau de p53 dans les deux lignées, ainsi que leur sensibilité différentielle au  $\text{CoCl}_2$ , nous a mené à examiner la phosphorylation de p53 sur certains de ses résidus. Il s'agit tout d'abord de la sérine 15 qui est rapidement phosphorylée et est connue pour stabiliser p53, en réponse à des dommages à l'ADN, à un stress oxydatif ou au cours d'une hypoxie. Ensuite, notre choix s'est porté sur la phosphorylation de la thréonine 81 qui est étroitement liée à l'activation de la fonction transcriptionnelle de p53 (Buschmann et al., 2001). Dans la lignée *SHSY5Y*, la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 est détectée très précocement à partir de deux heures de traitement, mais avec un maxima après six heures d'exposition. A cet instant, 25 % des cellules portent la phosphorylation sur la sérine 15 et 15% d'entre elles présentent celle-ci à la mitochondrie. Ceci est en corrélation avec le pourcentage (17 %) de cellules montrant une chute de potentiel mitochondrial après six

heures d'exposition au  $\text{CoCl}_2$ . Cette phosphorylation n'est plus détectée pour des temps supérieurs de traitement. Aucune phosphorylation sur ce résidu n'a été détectée dans la lignée ayant une protéine p53 mutée. En revanche, la phosphorylation sur la thréonine 81 a été observée dans les deux lignées après douze heures de traitement, et elle est retrouvée localisée dans le noyau. Cette phosphorylation n'a pas été observée, ni dans les temps précoces, ni pour des temps plus long que 12 heures.

La phosphorylation sur la thréonine 81 semble corrélér avec la phase d'exécution du processus de mort (PUMA, Bax- $\alpha$ ). La lignée *SKNBE(2c)* ne semble pas présenter une accumulation de PUMA ou de Bax- $\alpha$  même après la translocation de p53-Thr81 dans le noyau.

La méthodologie ainsi que les résultats expérimentaux ci-dessus sont détaillés et discutés dans l'article I suivant :

## **The spatio-temporal apoptotic response to a hypoxia-mimetic drug : $\text{CoCl}_2$ in two neuroblastoma cell lines, is depending on p53 status.**

Christophe STENGER, Thomas NAVES, Marie-Odile Jauberteau, Mireille VERDIER and Marie-Hélène RATINAUD.

- Cet article a été soumis pour publication dans le journal « *Apoptosis* ».

- Ces résultats ont également été acceptés pour une présentation sous forme de « poster » lors du congrès organisé par l'ECDO et intitulé : « *15<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis* » qui avait lieu du 26 au 31 octobre 2007 en Slovénie. Le résumé est présenté dans la partie annexe : **poster III**.

## II. Autres voies de signalisation induites par le traitement au chlorure de cobalt

### Induction des voies associées à la survie cellulaire

#### II.1 Activation de la voie MAPK/Erk

Il a été décrit (Kim et al., 2003 ; Yang et al., 2004) que le traitement de cellules au chlorure de cobalt induit l'activation des voies de transduction du signal associées normalement aux facteurs de croissances. C'est le cas dans notre modèle (**figure 35**). Dès deux heures d'exposition, les deux lignées cellulaires présentent une activation de la voie des MAPK Erk/pErk. Cette activation précoce disparaît pour 24 h de traitement parallèlement à la mort cellulaire.

Néanmoins, la signification biologique de cette activation par le  $\text{CoCl}_2$  n'est pas tout à fait comprise, puisque dans ces études, les auteurs suggèrent que dans des cellules C6 de gliomes, l'inhibition des voies des MAPK par PD98059 permet un effet protecteur mais ne diminue pas la cytotoxicité du cobalt. En revanche, dans la lignée HeLa l'inhibition de cette même voie entraîne une diminution significative de l'apoptose induite par  $\text{CoCl}_2$ .

Enfin, HIF-1 $\alpha$  est un substrat de la protéine Erk activée. L'inhibition de la phosphorylation par traitement avec PD98059 n'empêche pas la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  ni la liaison à l'ADN de HIF-1, mais la perte de toute activité transcriptionnelle.

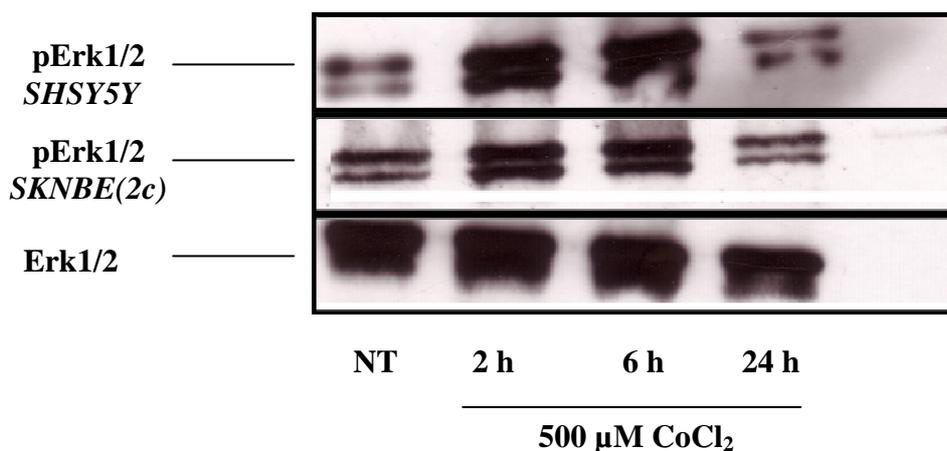


Figure 35 : Activation de la voie MAPK/Erk après traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  dans les deux lignées de neuroblastome.

Il est aussi intéressant de noter que la voie des MAPK/Erk constitue avec mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), l'une des voies majeures de régulation de l'autophagie. On peut faire l'hypothèse que la diminution de la disponibilité en ATP due au  $\text{CoCl}_2$ , est intégrée par la cellule à la fin du stress comme une privation énergétique.

Par ailleurs, dans le cas du cobalt, on ne peut exclure également que l'augmentation de sa concentration intracellulaire durant la cinétique de traitement, ne déclenche pas un stress calcique activant PYK2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) qui en retour phosphoryle Ras et initie la voie MAPK/Erk. Un article récent montre qu'une activation forte et prolongée de la voie MAPK/Erk a pour effet d'activer la caspase-8 indépendamment de Fas ou FADD (Cagnol et al., 2006).

## II.2 Activation de la voie SAPK/JNK

L'activation de la voie Erk nous a conduit à nous intéresser à une autre voie de signalisation de survie : la voie SAPK/JNK. D'une part, parce que cette voie peut être initiée par des stress cellulaires tels que des irradiations  $\gamma$  ou par un stress oxydatif, mais également car JNK est la kinase responsable de la phosphorylation sur la thréonine 81 de p53 (Buschmann et al., 2001)

Les résultats obtenus suggèrent, en effet, que son activation (par phosphorylation) corrèle avec le temps de traitement au chlorure de cobalt (**figure 36**), mais également que son activation maximale est située à douze heures de traitement, moment où la détection de la phosphorylation de p53 sur la thréonine 81 est observée.

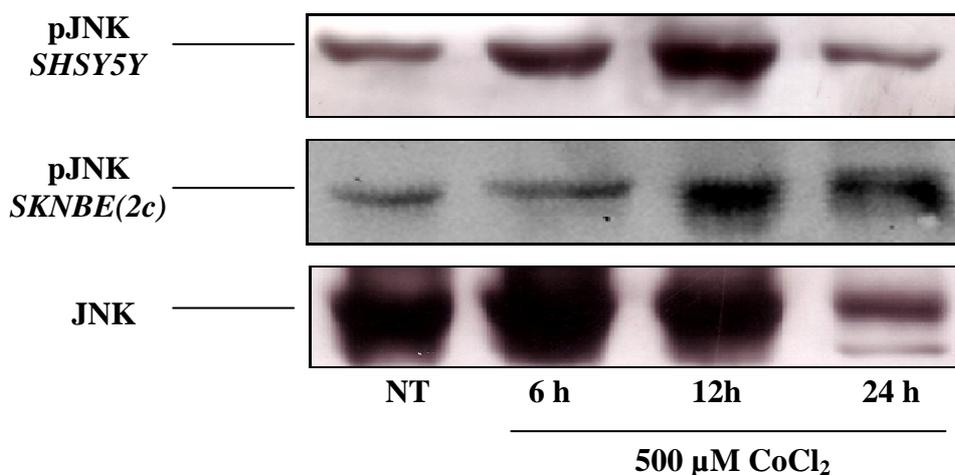


Figure 36 : Activation de la voie SAPK/JNK après traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  dans les deux lignées de neuroblastome.

### II.3 Conclusion générale de l'Article I

Les résultats de cet article, montrent clairement que les cellules *SHSY5Y* ( $p53^{wt}$ ) développent une réponse apoptotique dépendante de p53 suite à l'exposition au chlorure de cobalt. En effet, outre l'implication précoce et directe de la protéine p53 à la mitochondrie, des cibles transcriptionnelles (*Bax- $\alpha$*  et *PUMA*) sont transcrites et entraînent une apoptose irréversible et totale impliquant la caspase-3.

En ce qui concerne la lignée *SKNBE(2c)* ( $p53^{mt135}$ ), les résultats expérimentaux démontrent une phosphorylation sur la thréonine 81 et une translocation nucléaire de la forme mutée de p53, avec une activation tardive, mais importante de la caspase-3. Cependant, la détection à un niveau basal dans cette lignée, de protéines dont les gènes sont des cibles transcriptionnelles de p53 (*Bax- $\alpha$*  et *PUMA*), suggère des mécanismes alternatifs recrutés par les cellules. Une des hypothèses est l'implication de p73, qui est connu pour être capable de transcrire des gènes cibles de p53, en interagissant avec des facteurs co-activateurs et la machinerie transcriptionnelle.

# **Chapitre II : Etude des effets de l'extinction de p53 par ARNi sur l'apoptose induite par CoCl<sub>2</sub> dans la lignée de neuroblastome humain SHSY5Y**

## **I. Article II : signalisation de mort alternative à p53 après traitement au CoCl<sub>2</sub>.**

Précédemment dans l'article I, nous avons mis en évidence le rôle de p53 dans l'élaboration de l'apoptose initiée par le CoCl<sub>2</sub>. Il y est apparu que la localisation intracellulaire de p53, due à des étapes séquentielles de phosphorylation, régulait la cinétique des événements cellulaires menant *in fine* à la mort. Afin de confirmer ce rôle clé de p53, nous avons décidé d'éteindre l'expression de cette protéine en utilisant la technique de l'ARN interférence (ARNi).

L'ARN interférence ou ARNi est un processus de dégradation spécifique d'ARNm, éteignant ainsi l'expression d'une protéine particulière. Il est induit par l'introduction dans la cellule d'ARN double brin (dsRNA). Protozoaires, invertébrés, vertébrés, plantes, champignons, ont tous conservé cette capacité tout au long du processus évolutif. A l'origine, ce mécanisme cellulaire est un moyen de lutter contre les infections virales ou tout autre organisme ayant recours à la formation d'ARN double brin lors de leur cycle de vie. Les accidents de transcription ainsi que la transcription de séquences répétées inversées sont également dégradés par ARNi, permettant ainsi un « contrôle qualité » des produits issus de la transcription.

L'ARNi a été observée pour la première fois dans une étude (Napoli et al., 1990) basée sur l'étude du contrôle de l'expression de gènes dans le *petunia*. Les auteurs constatèrent que, lorsque l'on introduisait dans ces végétaux un gène codant pour un pigment sous le contrôle d'un promoteur fort, l'expression du gène introduit et de l'endo-gène était éteinte. Ce phénomène fut nommé « co-suppression ». Toutefois, ce n'est qu'en 1998, que l'on découvrit (Fire et al., 1998), que l'injection d'ARN double brin dans les gonades de *C. elegans*, résultait dans l'extinction du gène, dans la séquence de l'ARNm correspondait à

celle des ARN double brin injectés. Ceci identifia les ARN double brin, comme les inducteurs de l'ARNi. Puis, Baulcombe et Hamilton (1999), démontrèrent que l'étape cruciale dans l'élaboration de la signalisation de l'ARNi, était le clivage des dsRNA en petits fragments de 20 à 25 nucléotides : les siRNAs.

La compréhension des étapes et la connaissance des acteurs moléculaires impliqués dans le processus d'ARNi ont permis son utilisation à des fins expérimentales. C'est un outil de génétique inverse, offrant la possibilité d'étudier aisément les fonctions d'un gène particulier. De plus, il est aussi possible d'explorer de potentiels mécanismes alternatifs recrutés par la cellule, lors de l'extinction de la protéine d'intérêt.

On peut diviser la signalisation de l'ARNi en deux étapes successives. La première consiste en la détection et le clivage d'ARN double brin. Expérimentalement, dans les cellules d'invertébrés, on peut induire cette étape en y introduisant des ARN double brin long (dsRNA) (>200 paires de base). Dans les cellules eucaryotes supérieures, il est nécessaire d'introduire de courtes séquences d'ARN double brin, de seulement quelques nucléotides (siRNA) (<30 paires de base). Ceci a pour but d'éviter une réponse antivirale de type interféron, qui modifierait la physiologie cellulaire, et biaiserait les résultats.

Une fois dans la cellule, la structure d'ARN bicaténaire va être reconnue par une enzyme, appelée DICER, appartenant à la famille des ribonucléases de type III à multidomaines. DICER va cliver les dsRNA en plus petits fragments de 21 à 25 nucléotides afin de générer des siRNA.

Dans la deuxième étape les siRNA formés vont être pris en charge par un complexe multiprotéique nommé RISC (RNA-induced Silencing Complex). A l'intérieur de ce complexe, un siRNA simple brin, servira de matrice, (de « guide »), à la reconnaissance de l'ARNm complémentaire, ce qui entraînera son clivage et l'inhibition de sa traduction en protéine. Notons que la complémentarité de séquence entre l'ARNm ciblé et le siRNA « guide » doit être totale. Quelques bases non complémentaires suffisent pour empêcher le clivage. Ceci en fait donc un mécanisme très spécifique à l'extinction d'une protéine d'intérêt.

En 2006, le prix Nobel de Physiologie et Médecine, a été attribué, à Andrew Z. Fire et Craig C. Mello, pour leurs travaux concernant l'extinction de l'expression de gènes par la technologie de l'ARNi. La même année 14000 articles mentionnaient l'utilisation de cette technique dans de nombreux organismes, attestant de son intérêt.

Au vu des résultats obtenus dans l'article I, nous avons décidé d'étudier plus en détail le rôle de p53 dans le contrôle de l'apoptose de cellules de neuroblastome humain traités au CoCl<sub>2</sub>. Nous avons pour cela d'abord éteint l'expression de la protéine p53 par ARNi dans la lignée *SHSY5Y* portant un gène *TP53* sauvage. Puis nous avons induit l'apoptose par le chlorure de cobalt.

En premier lieu, nous avons vérifié l'efficacité de la transfection en ajoutant à l'agent transfectant des siARN non spécifiques d'un messenger protéique mais couplés à un fluorochrome. Le processus étant efficace à plus de 70%, et présentant une faible toxicité cellulaire nous avons pu envisager des expériences sur la lignée *SHSY5Y*. Curieusement la cinétique de mort observée après extinction transitoire de p53 (siRNA<sup>p53</sup>) et traitement par le chlorure de cobalt, était plus drastique dès 6 heures par rapport aux cellules non transfectées mais traitées (WT). Ensuite, nous avons caractérisé la signalisation de mort. Dans les cellules non transfectées et traitées au chlorure de cobalt, nous retrouvons une expression rapide de p53 (comme décrite précédemment). Dans les cellules transfectées (siRNA<sup>p53</sup>) et additionnées de chlorure de cobalt, le niveau d'expression de p53 reste résiduel. Il en était de même pour p21 une protéine impliquée notamment dans la régulation du cycle cellulaire, dont l'expression est dépendante de p53. Dans les cellules « sauvages », l'expression est rapidement activée après addition du CoCl<sub>2</sub>, tandis que dans les cellules transfectées et traitées, elle demeure faible. De plus dans ces dernières, l'absence d'expression de Bax-alpha, la présence de t-Bid à la mitochondrie, l'activation de la caspase-8, puis la chute du potentiel membranaire mitochondrial et l'activation de la caspase-3 nous laisse envisager que les cellules de la lignée *SHSY5Y* active une voie alternative de mort en l'absence de p53 et par conséquent d'une incapacité à activer la voie de signalisation mitochondriale (indépendante des récepteurs de mort).

Les résultats de cette étude sont décrits dans l'article II.

## **II. Article II : Recrutement d'une voie alternative de mort, induite par le CoCl<sub>2</sub> après extinction de p53 dans des neuroblastomes ?**

L'article suivant décrit les méthodes expérimentales, présente et discute les résultats obtenus au cours de cette étude :

### **An alternative cell death pathway induced by the hypoxia mimetic drug, cobalt chloride, in neuroblastoma cells with a down-regulated p53?**

Christophe STENGER, Thomas NAVES, Marie-Odile Jauberteau, Mireille VERDIER and Marie-Hélène RATINAUD.

- En préparation

- Les résultats ont également été soumis pour une présentation sous forme de « poster » lors du colloque organisé par l'institut de biologie intégrative (IFR 83) et intitulé : « *La mort cellulaire : du développement au vieillissement* » qui aura lieu du 3 au 4 décembre 2007 à PARIS. Le résumé est présenté dans la partie annexe : **poster IV**

# Chapitre III : Induction de l'apoptose par la desferoxamine (DFO), un autre mimétique de l'hypoxie, dans des neuroblastomes humains.

## I. Intérêt de ce travail

Suite à l'étude d'un stress hypoxique induit par le chlorure de cobalt, nous nous sommes intéressés à un autre mimétique chimique de l'hypoxie utilisé *in vitro* : la desferoxamine (DFO). Rappelons que la DFO est un puissant chélateur de fer inhibant ainsi les enzymes de dégradation de HIF-1 $\alpha$ , ayant pour effet de mimer une physiologie cellulaire de type hypoxique. Un article menant une étude comparative des effets apoptogènes du CoCl<sub>2</sub> et de la DFO sur des cellules leucémiques a montré que tout deux induisaient une apoptose via la voie mitochondriale (Guo et al., 2005). Néanmoins, les auteurs ont testé les effets d'un inhibiteur de phosphatases, le métavanadate, sur la réponse apoptotique induite (une étude ayant montré que le vanadate activait l'expression de HIF-1 $\alpha$ , (Gao et al., 2002)). Ici, de manière intéressante, le métavanadate inhibe l'apoptose induite par la DFO mais n'a aucun effet sur la mort induite par le CoCl<sub>2</sub>. Plus curieusement encore, dans ces cellules leucémiques, le prétraitement au métavanadate n'a aucun effet sur l'expression de HIF-1 $\alpha$ . La surexpression de HIF-1 $\alpha$  dans ces cellules, via un vecteur inductible, n'interfère aucunement avec l'apoptose induite par la DFO ou le CoCl<sub>2</sub>. Ces résultats montrent bien que, d'une part la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  par les mimétiques de l'hypoxie n'est pas indispensable à la réponse apoptotique induite, d'autre part que ces deux agents chimiques induisent l'apoptose par l'intermédiaire de voies communes mais impliquant des mécanismes d'initiation de l'apoptose différents.

Ces observations ainsi que le fait que la DFO, et non pas le cobalt, provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, nous ont incité à caractériser les potentielles voies moléculaires différentes, recrutées dans l'apoptose induite par la DFO. Pour cela, nous avons fait le choix, tout comme dans l'article II, de la lignée *SHSY5Y*.

Avant de présenter et de discuter les résultats préliminaires obtenus, il sera d'abord fait la présentation de la méthodologie.

## II. Méthodologie

La plupart des méthodes expérimentales utilisées dans ce chapitre III ont été détaillées dans le « matériel et méthodes » des articles I et II. Ne seront ici reprises, que les méthodologies nouvelles ou nécessitant une adaptation à l'étude de la DFO.

### II.1 Caractéristiques physico-chimique de la DFO

- Formule :

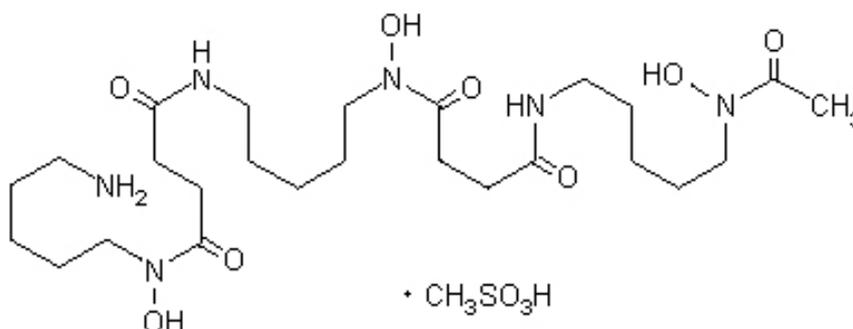


Figure 37 : Formule développée de la desferoxamine mesylate (DFO)

- Masse moléculaire : 656,79 g.mol<sup>-1</sup>

- Solubilité : solution aqueuse

Les solutions de DFO sont toujours préparées extemporanément dans des conditions stériles juste avant utilisation. La DFO sous forme de poudre est re-suspendue directement dans du milieu de culture RPMI 1640 complet (Invitrogen).

### II.2 Détermination de la cytotoxicité de la desferoxamine

La sensibilité de la lignée *SHSY5Y* à la DFO a été déterminée en utilisant un test XTT. Brièvement, les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96-puits à la concentration de 5.10<sup>4</sup> cellules/puits dans 100 µL de RPMI 1640 (Invitrogen) complet et incubée à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. A 80 % de confluence, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de DFO durant plusieurs intervalles de temps. Ensuite, la toxicité de l'agent mimétique fut déterminée à l'aide d'un test XTT (2,3-bis [2-métoxy-4-nitro-5-sulphophényl]-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (Roche). Le métabolisme mitochondrial des cellules vivantes, provoque la formation d'un produit coloré à partir du XTT, dont l'absorbance est mesurable à

492 nm. Cette absorbance est directement proportionnelle au métabolisme mitochondrial et reflète donc la viabilité cellulaire. Après le traitement à la DFO, le milieu est aspiré et changé par 100 µL d'un milieu minimum MEM sans rouge de phénol (Invitrogen) auquel sont ajoutés 50 µL d'un mixe réactionnel (XTT+tampon « électrons buffer »). La mesure de l'absorbance à 490 nm est normalisée avec l'absorbance lue à 690 nm dans un lecteur de microplaques MRX II (Dynex). La dose de 500µM de DFO fut choisie comme dose de travail

### **II.3 Détection qualitative de la fragmentation de l'ADN par *TUNEL***

Une des caractéristiques typiques de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN. Celle-ci peut être mise en évidence, par la méthode de marquage des extrémités 3'OH libres, générés lors du clivage, par des désoxyribonucléotides couplés à la fluorescéine (*TUNEL*).

Pour ce faire, les cellules sont comptées etensemencées dans une plaque 24-puits au fond desquels est disposé une lamelle de verre circulaire de 14 mm de diamètre (Menzel-Gläser). La concentration d'ensemencement par puit est de  $25.10^5$  cellules et les cellules sont mises en incubation jusqu'à ce que la confluence atteigne 70 %. Elles sont alors traitées par 500µM de DFO pour différents temps. Après induction chimique de l'hypoxie, les cellules (adhérentes et en suspension) sont lavées une fois avec du PBS 1X à 4°C puis fixée pendant 15 minutes avec de la PFA 4 % et perméabilisées à l'aide de TRITON X-100 durant 10 minutes à température ambiante. Après trois lavages au PBS 1X, les cellules sont mises en contact d'une solution de réaction (Roche) contenant, l'enzyme TdT<sup>77</sup> et des desoxynucléotides UTP, couplés à la fluorescéine, pendant 1 heure à 37°C à l'obscurité. La préparation est ensuite lavée trois fois avec du PBS 1X, puis montée sur lame de verre avec un milieu de montage. Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence (Zeiss) à la longueur d'onde de 488 nm.

### **II.4 Quantification par la méthode *TUNEL* de l'apoptose induite par la DFO par cytométrie**

Les cellules traitées à la DFO sont récupérées et les fractions adhérente et en suspension sont rassemblées. Le traitement est le même que celui décrit auparavant puis les cellules sont préparées pour un passage en cytométrie (FACS Vantage, Becton-Dickinson) à une concentration de 500 000 cellules/500 µL dans du PBS 1X.

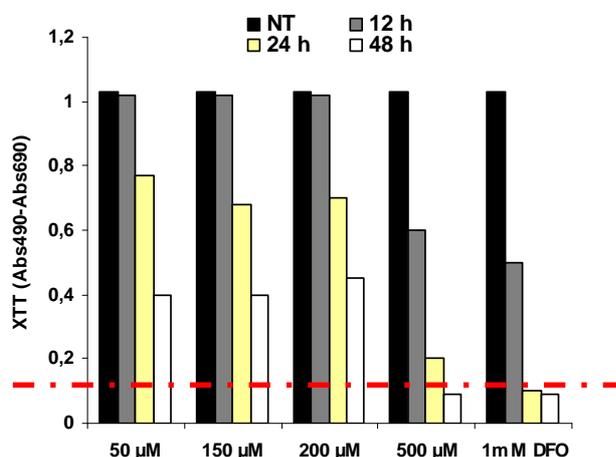
---

<sup>77</sup> TdT : Terminal desoxyribonucleotidyl Transferase

### III. Résultats

#### III.1 Cytotoxicité de la desferoxamine

Les lignées *SHSY5Y* et *SKNBE(2c)* ont été mis en contact de différentes doses de DFO et pour différents<sup>78</sup> temps puis leur sensibilité à l'agent mimétique fut déterminée par le test XTT (**figure 38**). Comme obtenu dans des expériences antérieures, la DFO ne présente aucune cytotoxicité sur la lignée *SKNBE(2c)* même après 48 heures de traitement (non montré). A l'inverse, la lignée *SHSY5Y* présente une sensibilité à la desferoxamine dépendante uniquement du temps, pour les doses de 50  $\mu$ M, 150  $\mu$ M et 200  $\mu$ M, mais dépendante du temps et de la dose pour des concentrations plus grandes de 500  $\mu$ M et 1mM de DFO.



**Figure 38 : Effet cytotoxique de la DFO sur la lignée *SHSY5Y*.**

(La ligne pointillée rouge représente la DO correspondant à un puit sans cellules, NT : non traitée)

Au vue de ces résultats et par souci de rigueur la dose de 500  $\mu$ M de DFO a été choisie comme dose de travail. Les résultats pourront ainsi être comparés à ceux de l'article I et II.

<sup>78</sup> Temps étudiés à partir de 12 h car des expériences préalables (n=3) montrent que la DFO ne présente aucun effet sur la viabilité cellulaire des *SHSY5Y* pour des temps courts.

### III.2 Traitement à la DFO et p53

Le traitement à la DFO entraîne, tout comme le cobalt, une phosphorylation spécifique sur la sérine 15. Cependant, cette forme phosphorylée n'est détectée que tardivement (24 h) et se localise dans le noyau, alors que, lorsque l'on détecte la forme non phosphorylée de p53, on remarque qu'elle est cytoplasmique et semble localisée à la mitochondrie. L'analyse par western-blot confirme une accumulation précoce (6 h) et par conséquent une potentielle implication de p53, suite à l'exposition des cellules *SHSY5Y* à 500  $\mu$ M de DFO pendant 24 heures.

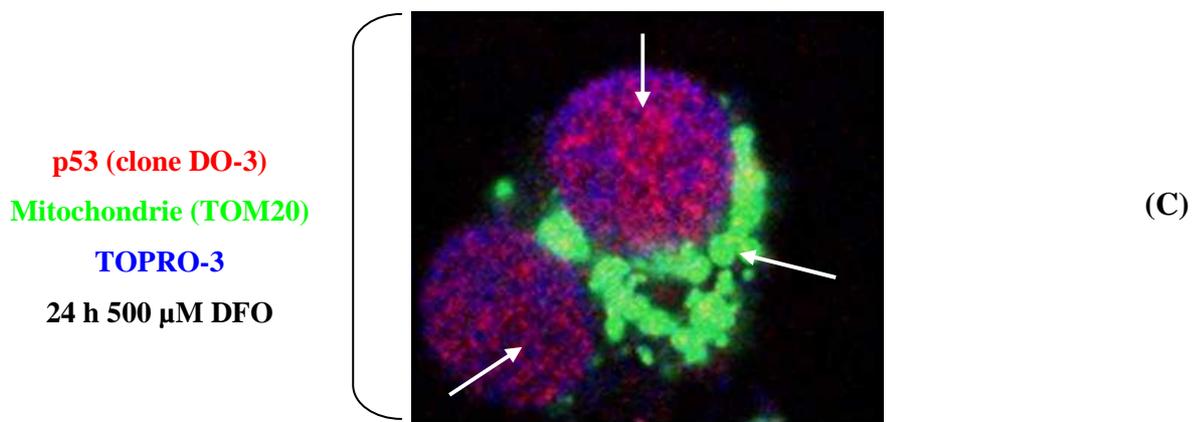
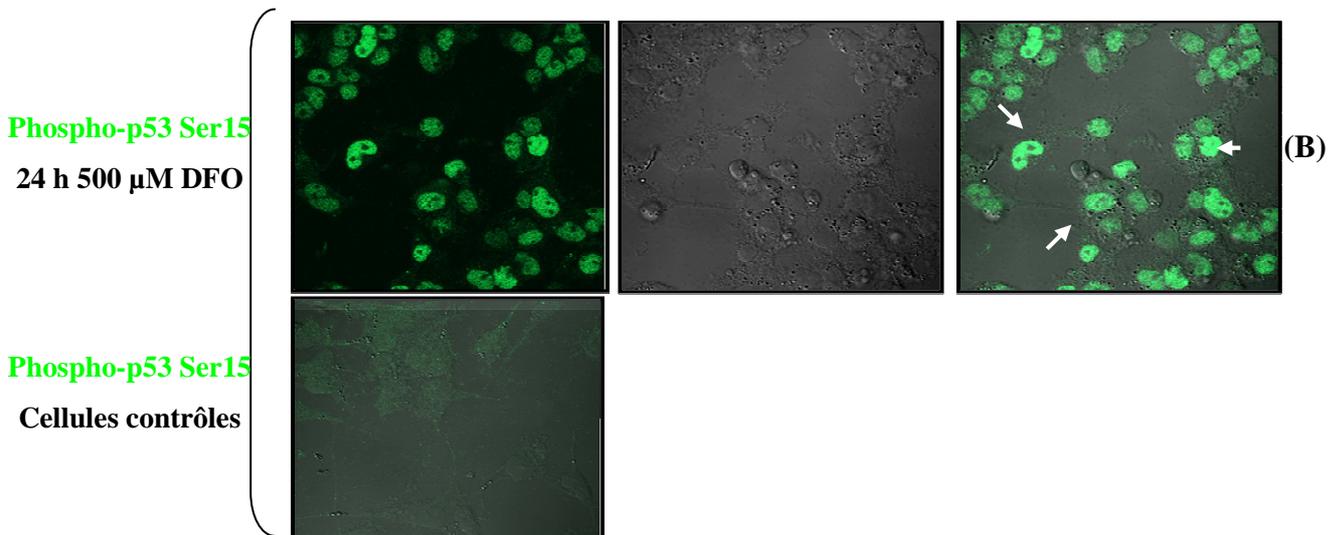


Figure 39: p53 est stabilisé (A), phosphorylé sur la sérine 15 et relocalisée dans le noyau (B) après traitement avec 500  $\mu$ M de DFO. La fraction cytosolique non phosphorylée est mitochondriale et nucléaire (C).

### III.3 Traitement à la DFO et protéine pro-apoptotique Bax

#### III.3.1 Accumulation de Bax dans les *SHSY5Y* traitées avec DFO<sub>500μM</sub>

La protéine Bax s'accumule progressivement au cours d'une cinétique longue, de 48 heures de traitement avec le mimétique de l'hypoxie, par rapport aux cellules contrôles.

#### III.3.2 Bax est localisé à la mitochondrie

La protéine pro-apoptotique Bax est localisée à la mitochondrie des cellules *SHSY5Y* après 24 heures de traitement à la DFO. Aucune détection à la mitochondrie n'est observée pour des temps plus précoces, malgré son accumulation immédiate mise en évidence par western-blot.

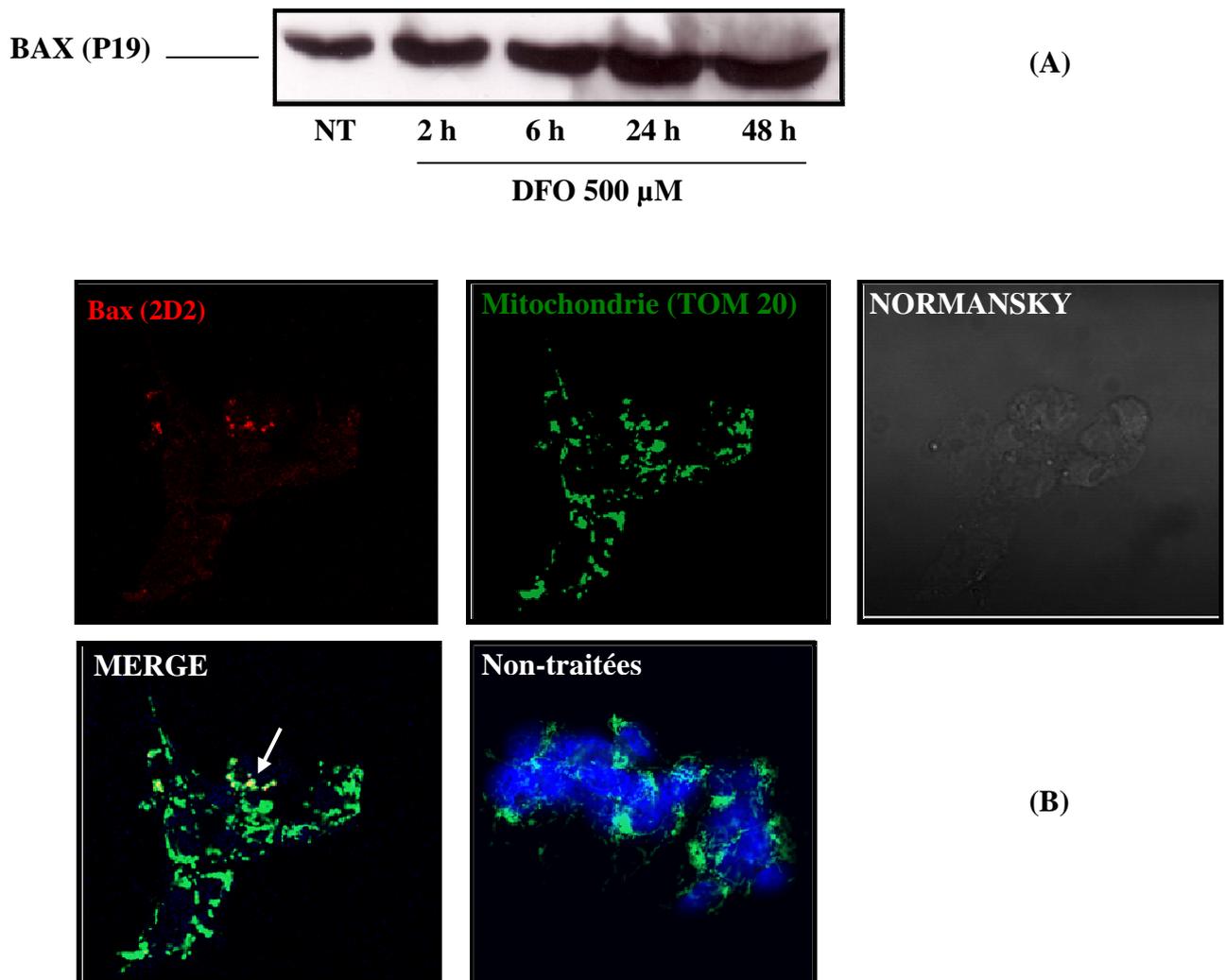


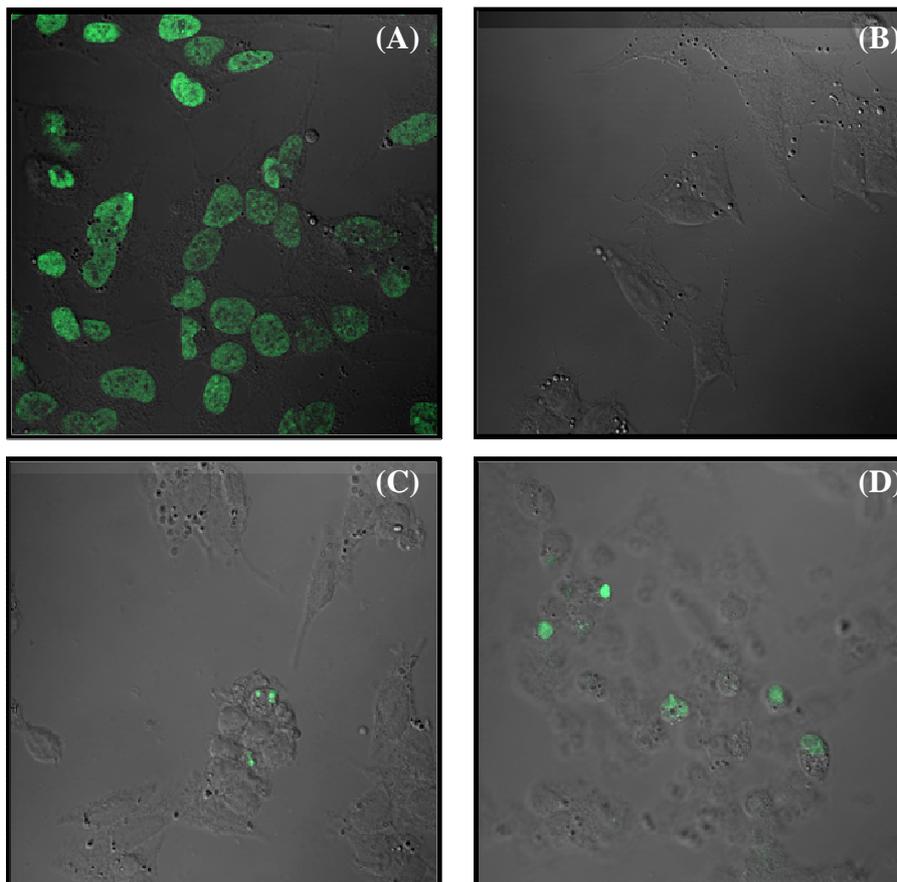
Figure 40 : Induction et accumulation de Bax dans les cellules *SHSY5Y* après traitement avec 500 μM de DFO (A). Puis, à partir de 24 heures, Bax se localise à la mitochondrie induisant la mort cellulaire (B).

### III.4 Les évènements mitochondriaux et nucléaires induisent l'apoptose

La relocalisation nucléaire de p53 stabilisé par sa phosphorylation sur la sérine 15, la présence de p53 dans le cytoplasme et plus particulièrement à la mitochondrie, ainsi que l'accumulation de la protéine pro-apoptotique Bax et sa localisation mitochondriale, sont des caractéristiques de l'induction d'une réponse de mort de type apoptotique. Nous avons donc voulu tester cette hypothèse et, pour ce faire, nous avons dans un premier temps détecté la fragmentation de l'ADN par la méthode TUNEL.

#### III.4.1 Détection qualitative de la fragmentation de l'ADN par TUNEL

La fragmentation de l'ADN est une caractéristique biochimique de la mort apoptotique. Lorsque les cellules sont traitées à la DFO 500  $\mu$ M, nous détectons à partir de 12 heures de traitement, mais surtout à 24 heures des cellules TUNEL-positives témoignant d'une fragmentation de l'ADN.



**Figure 41 : La fragmentation de l'ADN après un traitement à la DFO.**

Les *SHSY5Y* sont traitées à la DNase I puis soumise au marquage avec le mixe de réaction TUNEL complet (A) ou sans TdT (B), ceci servant de contrôles positif et négatif de réaction. Après 12 h (C) et 24 h (D) d'exposition à la DFO, un marquage TUNEL est observé.

### III.4.2 Détection quantitative de la fragmentation de l'ADN par TUNEL

Les cellules marquées par la méthode TUNEL (préalablement traitées avec 500  $\mu$ M de DFO), sont ensuite passées dans un cytomètre de flux et la fluorescence est détecté et quantifiée sur au moins 10 000 cellules. Les résultats montrent que pour les temps auxquels la viabilité est remarquablement affectée, c'est-à-dire à 24 h et 48 h de traitement, nous observons de 5 à 25 % d'apoptose respectivement.

L'analyse des cytogrammes a été faite à l'aide du logiciel WinMDI 2.8, la fenêtre R2 encadrant une augmentation initiale de la fluorescence par rapport à la population totale et la fenêtre R3 ciblant une augmentation franche de la fluorescence.

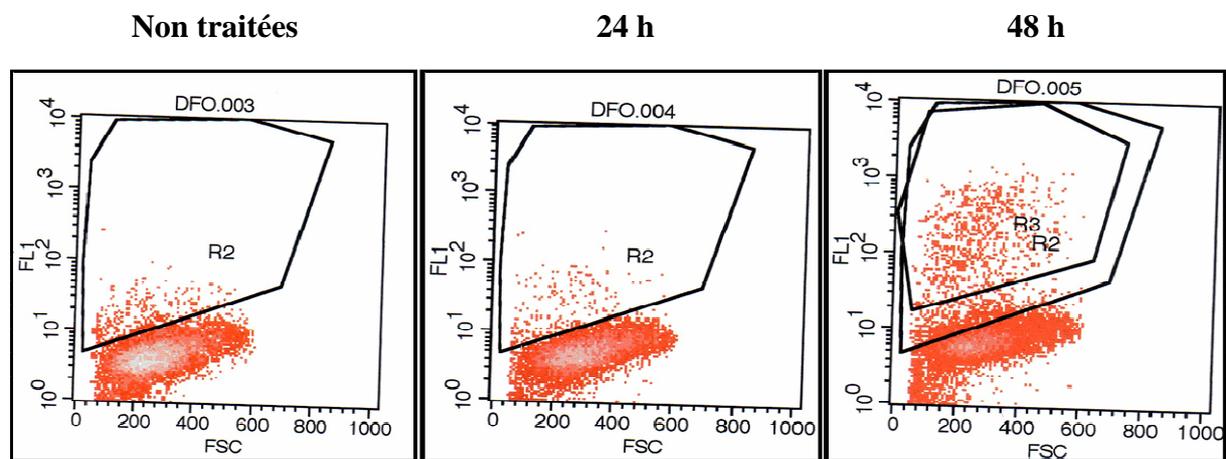


Figure 42: Quantification par cytométrie du marquage TUNEL après traitement des *SHSY5Y* par la DFO.

### III.5 Induction de la voie MAPK/Erk par la DFO

Tout comme le chlorure de cobalt, la desferoxamine provoque dans les cellules de neuroblastomes traitées, une activation de la voie des MAPK/Erk. Bien que cette activation soit nette, elle semble néanmoins sensiblement plus faible, que lors du traitement au cobalt de ces mêmes cellules.

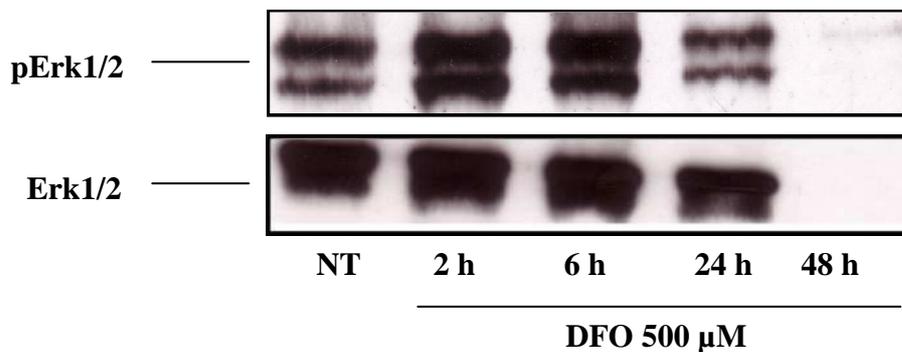


Figure 43: La voie MAPK/Erk est induite dans les *SHSY5Y* après traitement avec 500  $\mu$ M de DFO.

## IV. Discussion

Le stress hypoxique (voire anoxique) dans les tumeurs malignes est un paramètre fondamental dans l'évolution du cancer et est souvent, en fonction de son degré d'importance, un facteur de mauvais pronostic (Vaupel et al., 2007). La compréhension des mécanismes impliqués, pourrait aboutir à l'élaboration de nouveaux agents thérapeutiques, ciblant des acteurs moléculaires impliqués.

Dans notre étude, nous avons induit un stress hypoxique *in vitro* en utilisant un mimétique chimique de l'hypoxie, chélateur de fer, la desferoxamine (DFO). Une seule de nos lignées (celle portant un allèle sauvage du gène *TP53*) développe une sensibilité à l'exposition au mimétique. En effet, la lignée *SKNBE(2c)*, mutée pour p53, reste insensible à l'action de la DFO, même pour des traitements allant jusqu'à 72 heures. Une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène serait qu'à la surface de ces cellules se trouve une pompe (transporteur actif) de drogues. Bien que nous n'ayons pu détecter la présence de Pgp170 (gène *mdr1*) dans des extraits protéiques totaux de cette lignée, il est tout à fait envisageable qu'il existe au niveau membranaire un export de DFO, assuré par d'autres protéines dont celles de la famille MRP.

Une autre hypothèse, serait que les protéines assurant la régulation des points de contrôles de la progression du cycle cellulaire, dont fait partie p53, soient également mutées. Un déficit transcriptionnel, même partiel, dû à la mutation au codon 135 de p53 dans cette lignée, pourrait expliquer l'absence de protéines de contrôle du cycle cellulaire normalement transcrites par p53 (par exemple p21). Néanmoins, cette lignée continue à proliférer en présence de DFO. Or le fer est un cofacteur essentiel aux enzymes de réplication de l'ADN. Cet aspect rend la compréhension de la physiologie des *SKNBE(2c)* plus complexe.

La lignée *SHSY5Y* présente, pour des doses faibles et allant jusqu'à 200µM, une sensibilité dépendante du temps de traitement et non pas de la dose appliquée. Dans ce cas plus le traitement est long plus la cytotoxicité de la DFO sera marquée. En revanche, pour des doses plus importantes, comme 500 µM ou 1 mM de mimétique, le traitement provoque une réponse cellulaire dépendante, non seulement du temps, mais aussi de la dose. Au regard de ces observations et, afin de pouvoir comparer par la suite les effets de deux mimétiques de l'hypoxie, nous avons opté pour une dose de travail unique de 500 µM de DFO.

Les résultats expérimentaux de l'article I ont montré que, la mort cellulaire induite dans la lignée *SHSY5Y* suivant un traitement de 500  $\mu$ M de  $\text{CoCl}_2$ , impliquait p53. Nous avons donc, dans un premier temps, voulu confirmer que le stress apporté par l'exposition à la DFO entraînait une accumulation de p53. En effet, dès six heures de traitement, on détecte par western-blot une augmentation du niveau de protéine p53, par rapport aux cellules contrôles. La DFO bloquant la cellule en phase  $G_1/S$  du cycle cellulaire, cette accumulation de p53 est corrélée à sa phosphorylation, plus tardive sur la sérine 15 et à sa stabilisation. Contrairement aux résultats obtenus pour le chlorure de cobalt, cette forme phosphorylé de p53 ne se localise pas à la mitochondrie mais s'accumule dans le noyau. Ceci laisse penser que, l'élaboration de la réponse apoptotique est plus tardive et pourrait impliquer, essentiellement, la fonction transcriptionnelle de p53. Cependant, dans ce même modèle, nous avons pu mettre en évidence que la fraction non phosphorylé sur la sérine 15 de p53, était détectée dans le noyau mais aussi à la mitochondrie. Ceci peut être imputé à la fonction intégrative du signal de p53. En effet, dans ces travaux préliminaires, nous avons caractérisé uniquement la phosphorylation sur la sérine 15. De prochaines études pourraient préciser quels autres résidus de p53 sont spécifiquement phosphorylés en réponse à ce stress hypoxique. Ainsi, l'acide aminé phosphorylé et le moment où se situe ce processus conditionne sa localisation et donc sa fonction cellulaire (Bode et al., 2004).

La mort cellulaire induite par le  $\text{CoCl}_2$  impliquait le facteur pro-apoptotique Bax. Dans ce modèle, le traitement à la desferoxamine, provoque une accumulation significative de Bax par rapport aux cellules contrôles, dès les temps précoces d'exposition. Néanmoins, cette accumulation n'est suivie d'une mort cellulaire significative qu'à partir de 12 heures (cf test XTT). En outre, ce n'est qu'à partir de 24 heures de contact avec la DFO, que nous observons une localisation mitochondriale de Bax et pouvons suggérer une perméabilisation de la mitochondrie et une induction de l'apoptose.

Ceci, a été en partie, confirmé par une détection par la méthode TUNEL de la fragmentation de l'ADN, consécutive à une signalisation de mort. En effet, un marquage TUNEL-positif dans environ 5 % des cellules est observé à 24 heures de traitement. Après 48 heures de traitement nous détectons une apoptose d'environ 25 % des cellules. La mort induite par la desferoxamine est donc plus tardive que celle provoquée par le cobalt et nettement moins importante. Ceci pourrait être du aux effets différents provoqués par les deux mimétiques. Le chlorure de cobalt entre en compétition avec le fer, diminuant ainsi l'activité de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale, tandis que la DFO est un chélateur

de fer. Le cobalt induirait un stress cellulaire plus important et en conséquence une réponse de mort plus drastique.

Toutefois, le test XTT révèle une toxicité remarquable dès 12 heures de traitement. Or les acteurs moléculaires apoptotique (Bax) ou régulant directement ou indirectement l'apoptose (p53) ne sont pas significativement détectable à cet instant. Plusieurs explications sont possibles et devront être expérimentalement testées pour caractériser précisément la ou les voie(s) de mort activée(s) par le traitement à la DFO. D'une part, une réponse nécrotique secondaire peut être envisagée. En effet, une privation soudaine en fer peut être à l'origine de la mort des cellules les plus prolifératives (ayant un indice de répliation de l'ADN important). D'autre part, une apoptose induite par d'autres molécules pro-apoptiques telles que Bad (activation de la voie Akt) et aussi possible. Des études en cytométrie, du potentiel mitochondriale (sonde JC1) et de la perméabilité membranaire (TOPRO-3) pourraient répondre en partie à ces deux hypothèses.

Un autre processus cellulaire à envisager est l'autophagie. En effet, de plus en plus de travaux tendent à montrer qu'une réponse apoptotique temporellement décalée suite à un stress drastique est due à l'initiation préalable dans la cellule du processus autophagique. Des études, utilisant des marqueurs moléculaires de l'autophagie, tels que LC3-II (protéines de liaison aux microtubules présentent au niveau de la membrane de l'autophagosome) et Beclin-1 (protéine de l'appareil de Golgi, initiant la formation de l'autophagosome), seront à envisager. L'initiation préalable de l'autophagie pourrait résulter de dommages à la mitochondrie provoqués par la chélation de fer.

Pour conclure, on peut dire que le chlorure de cobalt et la DFO entraîne la mort par des mécanismes probablement différents, mais qui, induiraient *in fine* une signalisation de mort mitochondriale.

L'étude de l'hypoxie *in vitro* par l'utilisation de mimétiques de l'hypoxie présente des avantages pratiques, avec une bonne reproductibilité des résultats. Néanmoins, bien qu'ils reproduisent certains effets moléculaires (stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , implication majeure de p53, de la mitochondrie et induction de l'apoptose) de l'hypoxie physiologique, leurs divergences quant à l'implication de voies de transduction du signal de mort ainsi que des acteurs moléculaires impliqués, posent des limites dans la généralisation des résultats. Ce dernier point sera plus amplement discuté dans la partie suivante : « **Conclusion générale et perspectives** ».

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Au cours de ce travail nous avons exploré, les voies de signalisation de mort déclenchées par un stress de type hypoxique. Le chlorure de cobalt a été utilisé comme molécule mimétique *in vitro* de l'hypoxie. Cette étude a été réalisée en trois principales étapes. Nous avons tout d'abord vérifié la signalisation de mort (voie intrinsèque), induite par le chlorure de cobalt dans les deux lignées de neuroblastome humain. Ensuite, nous avons confirmé le rôle de la phosphoprotéine p53 dans la signalisation de mort au niveau mitochondrial, via sa phosphorylation précoce sur la sérine 15. Simultanément, nous avons déterminé l'évolution de la localisation intracellulaire de la protéine p53 lors de la phase d'exécution de l'apoptose (en étudiant la phosphorylation de la thréonine 81). Enfin, afin d'étudier plus précisément le rôle de cette dernière dans la signalisation apoptotique, nous avons éteint son expression protéique par la technique de l'ARNi. Le but était d'empêcher p53 de transactiver des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et/ou dans la mort cellulaire (p21, Bax, PUMA). D'autre part, l'étude des voies de transduction du signal et de signalisation de mort activées faisant suite à une exposition avec un autre mimétique de l'hypoxie couramment utilisé *in vitro*: la desferoxamine, ont été également étudiées dans ces lignées.

Dans une première partie, nous avons exploré les voies de transduction du signal apoptotique induites par le  $\text{CoCl}_2$ . Pour ce faire, la cytotoxicité de la molécule mimétique de l'hypoxie a été étudiée et une concentration de 500  $\mu\text{M}$  a été retenue. Cette dernière était suffisante pour induire une mort cellulaire modérée et progressive sans phénotype nécrotique. Le chlorure de cobalt provoque des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de la mort cellulaire dans les deux lignées, et ce dans un intervalle de temps relativement court (24 h). L'examen morphologique des cellules et du noyau ainsi que l'étude du potentiel membranaire mitochondrial, ont orienté notre étude vers l'apoptose. En effet, la perte du potentiel membranaire mitochondrial est un événement caractéristique de l'apoptose, ainsi que la condensation de l'ADN. Cette dernière a été observée dans les deux lignées après traitement au chlorure de cobalt. Cependant, dans la lignée *SHSY5Y*, il semble se produire deux vagues successives de dépolarisation membranaire mitochondriale. Un premier collapse du potentiel membranaire mitochondrial, précoce (6 h), implique seulement une fraction des cellules (environ 20%) et est corrélée à la présence de p53 phosphorylé sur la sérine 15 (p53Ser15) à la mitochondrie et une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax- $\alpha$ . Une seconde vague de signalisation, plus tardive (à partir de 12 h), est concomitante à la localisation nucléaire de p53 phosphorylée sur la thréonine 81 (p53Thr81)

et à l'accumulation de la protéine pro-apoptotique PUMA. Il se produit une chute du potentiel membranaire mitochondrial, suivie d'une mort cellulaire concernant la grande majorité des cellules.

Dans la lignée *SKNBE(2c)*, mutée pour p53, aucune phosphorylation de p53 sur la Ser15 n'a été détectée. En outre, cette lignée subit une chute du potentiel membranaire mitochondrial à partir de 12 h d'exposition au chlorure de cobalt. Celle-ci est parallèle à la translocation nucléaire de p53Thr81, mais aucune variation significative du niveau d'expression de PUMA et de Bax- $\alpha$  n'a été détectée au cours de la cinétique de traitement au cobalt. Néanmoins, la détection d'un niveau basal d'expression de deux gènes cibles de p53 dans cette lignée, suggère que malgré la présence d'un mutant de p53 transcriptionnellement inactif, les gènes cibles de p53 peuvent être transcrits (de façon plus modérée). Parmi eux d'autres facteurs de transcription, tels que p73 ou FOX3A (Melino et al., 2004) pourraient être impliqués. De plus, il a été montré récemment que la mort induite par ischémie/reperfusion dans des cellules intestinales était contrôlée par PUMA, mais que son expression était indépendante de p53 (Wu et al., 2007). Cependant, l'absence de variation de ces protéines au cours de la cinétique, pourrait être due au fait, que ces facteurs de transcription, appartiennent à des voies de signalisation indépendantes de celles activées par l'exposition à la molécule mimétique de l'hypoxie.

La différence dans la cinétique de la réponse apoptotique entre ces deux lignées, pourrait également être due au statut du facteur de transcription N-Myc. En effet, dans la lignée *SKNBE(2c)*, il a été décrit que le gène codant la protéine N-myc est amplifié (Tweddle et al., 2001). C'est un régulateur majeur de la prolifération et de la différenciation cellulaire. L'expression et l'activité des protéines de la famille myc sont fréquemment dérégulées (souvent par amplification génique ou translocation chromosomique), dans les cancers humains, illustrant leur activité oncogénique. Néanmoins, la surexpression de N-Myc est associée à deux types de réponses cellulaires opposées. D'une part, la prolifération cellulaire, d'autre part la mort par apoptose. L'élément clé, formant la balance entre ces deux réponses est p53. N-Myc agit positivement sur l'expression de p14<sup>ARF</sup>. Ainsi p14<sup>ARF</sup> inhibe MDM2 et stabilise p53 en empêchant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome 26S. Ceci entraîne dans le cas d'une expression anormalement élevée en signaux de prolifération, l'initiation d'une apoptose dépendante de p53 et a pour effet de contrecarrer la signalisation de prolifération de N-Myc. Dans les neuroblastome où N-Myc est amplifié, on retrouve constamment co-amplifié un autre facteur de transcription : Twist-1 (Valsetia-Wittman et al., 2004). Il a été montré que, celui-ci, inhibe le processus de mort cellulaire dépendant de p53,

en inhibant p14<sup>ARF</sup> (Maestro et al., 1999) et en empêchant la phosphorylation de p53 sur la sérine 20 (Stasinopoulos et al., 2005), élément essentiel à son activation. Ainsi, N-Myc et Twist-1 coopéreraient en induisant, la prolifération cellulaire (N-Myc), et en inhibant la mort cellulaire (Twist-1). Ceci pourrait être en adéquation avec l'évolution de l'expression de p53 observée dans la lignée mutée. En absence de stress, p53 est retrouvée en grande quantité dans les cellules. N-Myc y étant décrit comme amplifié, il pourrait via p14<sup>ARF</sup>, inhiber MDM2 et stabiliser p53. Cette dernière étant transcriptionnellement inactive, elle ne peut déclencher directement une signalisation apoptotique. Lorsque les cellules sont mises en contact du chlorure de cobalt, le stress entraîne une diminution progressive de p53 résultant de l'inhibition de p14<sup>ARF</sup> par l'implication de Twist-1. Il serait donc intéressant de caractériser l'évolution de l'expression de Twist-1 dans ces deux lignées et de déterminer ses interactions potentielles avec p53. Ceci est d'autant plus important que nos résultats suggèrent tendent à montrer une implication de p53 dans la signalisation apoptotique.

Au cours du processus de mort étudié dans la lignée *SHSY5Y*, la localisation de p53Ser15 à la mitochondrie et le collapse du potentiel membranaire mitochondrial qui lui fait suite, entraîne l'activation de la caspase-3. En outre, l'accumulation des protéines pro-apoptotiques Bax- $\alpha$  et PUMA durant le traitement au CoCl<sub>2</sub>, contribue très probablement à ce collapse à partir de 6 h puis plus tardivement après 12 h de traitement et jusqu'à l'établissement d'une mort totale. En revanche, dans la lignée *SKNBE(2c)*, cette activation est légèrement plus tardive et ne devient significative qu'à partir de 12 h. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence d'accumulation de la protéine Bax- $\alpha$  ou PUMA au cours de la cinétique de traitement. On peut suggérer que, d'autres acteurs moléculaires seraient impliqués dans la perméabilisation de la mitochondrie. Une des hypothèses pourrait être l'implication de la protéine Bad. En effet, le CoCl<sub>2</sub> active des voies de survie, telles que la voie MAPK/Erk ou JNK, et leur inactivation tardive (à partir de 12 h de traitement) pourrait contribuer à lever l'inhibition qu'elles exercent sur Bad en empêchant sa phosphorylation et donc sa séquestration par le protéine cytoplasmique 14-3-3. Cette dernière, pourrait alors interagir avec des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-x<sub>L</sub>, et libérer une autre protéine pro-apoptotique, induisant la perméabilisation de la mitochondrie, l'activation de la caspase-3 et l'exécution l'apoptose. Des travaux récents suggèrent que l'activation prolongée de la voie MAPK/Erk pourrait entraîner l'auto-activation de la caspase-8 indépendamment de l'implication de FADD et par conséquent des récepteurs de mort (Cagnol et al., 2006). La caspase-8, ainsi activée, pourrait cliver la protéine Bid, entraînant la relocalisation de tBid à la

mitochondrie, la chute du potentiel membranaire mitochondrial et la cascade de signalisation apoptotique.

Les résultats expérimentaux concernant l'implication de p53 dans la mort induite par le CoCl<sub>2</sub>, nous ont amené à étudier plus en détail le rôle de p53 dans l'induction de la signalisation de mort par un stress hypoxique. Pour ce faire, nous avons travaillé avec la lignée *SHSY5Y* dont le gène *TP53* est sauvage (wt). Nous avons éteint l'expression de la protéine par la technique d'ARNi. Lors du traitement avec le chlorure de cobalt, les cellules sauvages (wt), comme les cellules transfectées, semblaient continuer à mourir. Au vue des précédents résultats, il était alors plausible qu'une voie de signalisation alternative de mort soit impliquée. Celle-ci semblerait s'effectuer via : la chute du potentiel membranaire mitochondrial et l'activation de la caspase-3. Cependant, l'extinction de la protéine p53 et de Bax- $\alpha$ , laissent envisager l'implication d'une autre protéine pro-apoptotique à la mitochondrie.

Des travaux (Jung et al., 2004 ; Weinmann et al., 2004) suggèrent que la caspase-8 et la voie des récepteurs de mort pourraient intervenir dans l'apoptose induite par l'hypoxie et le chlorure de cobalt. En outre, d'autres auteurs ont démontré l'implication de Bid dans la signalisation de mort induite par des dommages à l'ADN (Kamer et al., 2005). De plus, son clivage ne dépendrait pas systématiquement de la caspase-8 (Garnett et al., 2007) ou de l'oligomérisation des récepteurs de mort (Tang et al., 2000). Par conséquent, nous avons analysé le facteur pro-apoptotique Bid. Après une exposition à 500  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub>, nous avons mis en évidence la présence, dans les cellules transfectées (siARN<sup>p53</sup>), du fragment clivé tBid (Truncated Bid) à la mitochondrie. Ceci est en accord avec l'activation de la caspase-8 (en amont) et la chute du potentiel membranaire mitochondrial (en aval). En absence de p53, la cellule semble initier l'apoptose via une voie alternative, avec des acteurs moléculaires associés à la voie de signalisation de mort « extrinsèque ». Il faudrait déterminer comment et par l'intermédiaire de quel facteur, un stress cobaltique peut induire l'activation de la caspase-8. Une hypothèse impliquerait l'activation de la caspase-2. En effet, celle-ci a été décrite comme pouvant cliver la procaspase-8 lors de l'apoptose induite par les céramides et l'étoposide dans des cellules lymphocytaires T (Lin et al., 2004). D'autres travaux (Wieder et al., 2001), suggèrent que la caspase-8, pourrait être activée, par la caspase-3. En effet, il semble que le traitement de ces cellules par de l'épirubicine ou du taxol, engage la voie de signalisation apoptotique mitochondriale, ainsi que l'activation de la caspase-3 et de la caspase-8. Dans ce modèle, l'activation de cette dernière peut être bloquée, par un inhibiteur de la caspase-3. En revanche, l'expression d'un mutant FADD dominant négatif n'a aucun

effet. Le traitement par ces molécules n'induit pas non plus de synthèse endogène de FasL. Ainsi l'activation de la caspase-8 (même dans des cellules immunitaires), n'est pas forcément liée au recrutement des récepteurs de mort membranaires, mais peut faire suite à des stress cellulaires « internes ». Bien que son activation ne semble pas nécessaire à la signalisation de mort mitochondriale, elle pourrait jouer un rôle d'amplification du signal de mort afin que l'apoptose se déroule dans un intervalle de temps succinct. Nos résultats semblent compatibles avec ces travaux. En effet, dans les cellules *SHSY5Y*, p53 est nettement impliqué dans l'élaboration de la réponse de mort. Son absence, dans les cellules transfectées, n'empêche pas l'induction de l'apoptose par le chlorure de cobalt, mais celle-ci semble conduite par une voie alternative. Des expériences complémentaires de détection de l'activité de caspase-2, seront à envisager dans les cellules non-transfectées afin de déterminer si celle-ci coopèrent avec p53 dans l'exécution de la mort cellulaire.

Nos résultats obtenus après traitement au  $\text{CoCl}_2$ , sur deux lignées de neuroblastome différant par la capacité transcriptionnel de leur protéine p53, et l'extinction de cette protéine par ARN interférence, sont en faveur d'une dichotomie des fonctions de p53. En effet, l'extinction de l'expression de p53 dans la lignée *SHSY5Y* n'abolit pas l'induction de la mort cellulaire après traitement au chlorure de cobalt et on n'observe pas non plus le délai présent dans l'induction de l'apoptose dans la lignée *SKNBE(2c)*. Ceci tend à confirmer l'implication précoce de p53Ser15 à la mitochondrie dans l'induction de la signalisation de mort et également à confirmer son absence dans la lignée *SKNBE(2c)*. Dans cette dernière, le délai d'initiation de la mort est probablement due à l'absence d'un recrutement précoce de p53, alors que sa phosphorylation sur la thréonine 81 est détectée plus tardivement après 12 h de traitement. Il est envisageable que l'intégration du stress appliqué est dépendante de nombreuses protéines (comme ATM/ATR ou Chk1/2), qui peuvent se trouver inactivées dans la lignée mutée pour p53. Néanmoins, p53 semble jouer un rôle prépondérant dans l'intégration du signal et l'élaboration de la première vague de mort cellulaire. En effet, dans les cellules préalablement transfectées avec des siRNA<sup>p53</sup>, son absence force la cellule à recruter une voie de mort alternative qui n'induit pas l'exécution de l'apoptose en deux vagues successives. Ce rôle « mitochondrial » de p53, indépendant de sa fonction transcriptionnel, pourrait être mieux caractérisé en transfectant les cellules de la lignée *SKNBE(2c)* avec des siRNA<sup>p53</sup>. La protéine p53 étant mutée dans son domaine de liaison à l'ADN dans cette lignée, son extinction par ARN interférence permettrait d'étudier les voies

moléculaires potentiellement impliquées dans le recrutement de p53 lors d'un stress de type hypoxique.

La dernière partie de notre travail, a été consacrée à l'étude des effets d'une exposition à une autre molécule mimétique de l'hypoxie : la desferoxamine (DFO). Le chlorure de cobalt et la DFO agissent tous deux sur la mitochondrie, en interférant avec le processus de respiration mitochondriale (Clyne et al., 2001), entraînant l'apparition d'espèces oxygénées réactives ou ROS (Zou et al., 2001), et provoquant des dommages à l'ADN. La desferoxamine (chélateur de fer) induirait, en plus, l'arrêt du cycle cellulaire en G<sub>1</sub>-S (Dayani et al., 2004). Ces deux modes d'action différents permettraient de comprendre les résultats du test de cytotoxicité de la DFO. En effet, l'insensibilité des cellules *SKNBE(2c)* pourrait être due à l'incapacité d'élaborer une signalisation cellulaire de mort suite à l'exposition au CoCl<sub>2</sub> qui vraisemblablement induit des dommages à l'ADN et active par la voie ATM/ATR.

La DFO a un effet temps et dose dépendant, pour des concentrations supérieures à 200µM. Toutefois la signalisation intracellulaire activée semble lente à s'exécuter. Afin de pouvoir comparer les voies de transduction activées entre les deux mimétiques de l'hypoxie, nous avons choisi une dose unique de 500 µM. Après traitement des cellules à la DFO, nous avons mis en évidence une accumulation de Bax, ainsi que sa localisation à la mitochondrie, suivie d'une fragmentation de l'ADN, témoignant de l'exécution de l'apoptose. Néanmoins, la dynamique et la localisation cellulaire de p53 est différente de celle retrouvée au cours de la signalisation induite par le CoCl<sub>2</sub>. En effet, lorsque l'on traite avec 500 µM de DFO, on constate une accumulation précoce dès 6 h de p53. Néanmoins, la forme phosphorylée sur la serine 15, n'est détectée qu'après 24 h de traitement et est localisée dans le noyau. La fraction non phosphorylée de p53, localisée à la mitochondrie, correspondrait à la fraction basale de p53 liée à Bcl-x<sub>L</sub>, empêchant celle-ci d'exercer son activité anti-apoptotique.

Ces résultats soulèvent de nouvelles interrogations concernant le(s) rôle(s) exact(s) de p53 dans la réponse de mort à l'hypoxie. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour caractériser plus précisément le phénomène. En effet, la différence observée au sein des deux lignées, ainsi que l'implication de p53 au sein d'une voie de signalisation en fonction de la molécule mimétique utilisée, peuvent être envisagés à différents niveaux.

Tout d'abord au niveau transcriptionnel. La mutation dans le domaine de liaison à l'ADN de p53 dans la lignée *SKNBE(2c)*, empêcherait p53 de présenter une activité transcriptionnelle. Des expériences de réactivation de mutants transcriptionnels de p53 sont possibles grâce à une molécule nommée PRIMA-1 (p53-Reactivation and Induction of Massive Apoptosis 1). Celle-ci restaure l'activité transcriptionnelle de protéines mutantes en

rétablissant une conformation tridimensionnelle adéquate (Bykov et al., 2002). Des expériences préliminaires ont été menées au laboratoire, confirmant que le traitement des cellules *SKNBE(2c)* par PRIMA-1, induisait une mort massive en fonction du temps, et ce, quelque soit la dose appliquée. Ces travaux devront cependant être approfondis, car cet effet dose-indépendant semble surprenant.

Outre sa fonction de facteur de transcription, p53 est également décrit comme un effecteur de l'apoptose, souvent comparé à une protéine « BH3-only » (Yee et al., 2005). Dans notre modèle, c'est son activité mitochondriale qu'il a été possible de caractériser. Toutefois, afin de déterminer avec plus de précision l'importance de la part « transcriptionnelle » de p53 dans la réponse au cobalt, il est possible d'utiliser une molécule : la  $\mu$ -pifithrin. Cette molécule inhibe spécifiquement la voie de l'apoptose mitochondriale contrôlée par p53 en l'empêchant de se lier à Bcl-x<sub>L</sub> ou Bcl-2 sans avoir de conséquences sur l'activité transcriptionnelle de p53. En cela, elle est préférable à la  $\alpha$ -pifithrin qui inhibe la fonction transactivatrice de p53, mais également en partie sa translocation mitochondriale (Strom et al., 2006). De manière complémentaire, l'utilisation de la nutline (inhibiteur de l'interaction p53/MDM2), stabilise p53 et favorise son accumulation en l'absence de tout stress cellulaire. L'augmentation de la fraction cytoplasmique de p53 dans des cellules non stressée entraîne une translocation d'une partie vers la mitochondrie et le déclenchement de l'apoptose. Lorsque l'on traite simultanément ces cellules avec de l'agglutinine (un inhibiteur du transport nucléaire de p53), il est possible d'analyser indépendamment, la voie mitochondriale de l'apoptose induite par p53 (Chipuk et al., 2003).

Dans cette étude, des voies moléculaires impliquées dans la signalisation de mort suivant un stress de type hypoxique ont été explorées. Néanmoins, les résultats différents obtenus, au niveau moléculaire, entre deux mimétiques de l'hypoxie, suggèrent que ces derniers ne peuvent reproduire que certains des aspects de l'hypoxie. De plus, la réponse cellulaire au stress hypoxique semble rester hétérogène et dépend largement du type cellulaire

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Akao Y., Otsuki Y., Kataoka S., Ito Y., Tsujimoto Y. **Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes.** *Cancer Res.* 54:2468-2471; 1994.
- Alarcon R. M., Denko N. C., Giacca A. J. **Genetic determinants that influence hypoxia-induced apoptosis.** *Norvatis Found. Symp.* 240:115-128; 2001.
- Altieri D. C. **Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer.** *Oncogene.* 22:8581-8589; 2003.
- Andreelli F., Viollet B., Vaulont S. **Physiological roles of AMP-activated protein kinase (AMPK).** *Med. Sci.* 19:541-542; 2003.
- Anguiano-Hernandez Y. M., Chartier A., Huerta S. **Smac/DIABLO and colon cancer.** *Anticancer Agents Med. Chem.* 7:467-473; 2007.
- Annis M. G., Soucie E. L., Dlugosz P. J., Cruz-Aguado J. A., Penn L. Z., Leber B., Andrews D. W. **Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis.** *EMBO J.* 24:2096-2103; 2005.
- Appella E., Anderson C.W. **Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses.** *Eur. J. Biochem.* 268:2764-2772; 2001.
- Axelsson H., Fredlund E., Ovenberger M., Landberg G., Pählman S. **Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors.** *Semin. Cell. Dev. Biol.* 16:554-563; 2005.
- Balmain A., Gray J., Ponder B. **The genetics and genomics of cancer.** *Nat. Genet.* 33 Suppl:238-244; 2003.
- Bao Q., Shi Y. **Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases.** *Cell Death Differ.* 14 :56-65; 2007.
- Basu A., DuBois G., Haldar S. **Posttranslational modifications of Bcl2 family members--a potential therapeutic target for human malignancy.** *Front. Biosci.* 11:1508-1521; 2006.
- Becker K., Marchenko N. D., Maurice M., Moll U. M. **Hyperubiquitylation of wild-type p53 contributes to cytoplasmic sequestration in neuroblastoma.** *Cell Death Differ.* 14:1350-1360; 2007.
- Bennett M., Macdonald K., Chan S. W., Luzio J. P., Simari R., Weissberg P. **Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis.** *Science.* 282:290-293; 1998.

- Bensaad K., Tsuruta A., Selak M. A., Vidal M. N., Nakano K., Bartrons R., Gottlieb E., Vousden K. H. **TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis.** *Cell*. 126:107-120; 2006.
- Bensaad K., Vousden K. H. **p53: new roles in metabolism.** *Trends Cell Biol.* 17:286-291; 2007.
- Berube C., Boucher L. M., Ma W., Wakeham A., Salmena L., Hakem R., Yeh W. C., Mak W., Benchimol S. **Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter protein RAIDD.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102:14314-14320; 2005.
- Blommaert E. F., Luiken J. J., Meijer A. J. **Autophagic proteolysis: control and specificity.** *Histochem. J.* 29:365-385; 1997.
- Bode A. M., Dong Z. **Post-translational modification of p53 in tumorigenesis.** *Nat. Rev. Cancer.* 10:793-805; 2004.
- Bohensky J., Shapiro I. M., Leshinsky S., Terkhorn S. P., Adams C. S., Srinivas V. **HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway.** *Autophagy.* 3:207-214; 2007.
- Borel F., Lohez O. D., Lacroix F. B., Margolis R. L. **Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:9819-9824; 2002.
- Bourdon J. C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D. P., Saville M. K., Lane D. P. **p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity.** *Genes Dev.* 19:2122-2137; 2005.
- Borner C. **The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions.** *Mol. Immunol.* 39:615-647; 2003.
- Boutros R., Lobjois V., Ducommun B. **CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?** *Nat. Rev. Cancer.* 7:495-507; 2007.
- Brady H. J., Salomons G. S., Bobeldijk R. C., Berns A. J. **T-cells from baxalpha transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53.** *EMBO J.* 15:1221-1230; 1996.
- Brahimi-Horn M. C., Pouyssegur J. **Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease.** *Biochem. Pharmacol.* 73:450-457; 2007.

- Brooks C. L., Li M., Gu W. **Monoubiquitination: the signal for p53 nuclear export ?** *Cell Cycle*. 3:436-438; 2004.
- Buchmann A. M., Skaar J. R., DeCaprio J. A. **Activation of a DNA damage checkpoint response in a TAF1-defective cell line.** *Mol. Cell. Biol.* 24:5332-5339; 2004.
- Bullock A. N., Henckel J., DeDecker B. S., Johnson C. M., Nikolova P. V., Proctor M. R., Lane D. P., Fersht A. R. **Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:14338-14342; 1997.
- Buschmann T., Minamoto T., Wagle N., Fuchs S. Y., Adler V., Mai M., Ronai Z. **Analysis of JNK, Mdm2 and p14(ARF) contribution to the regulation of mutant p53 stability.** *J. Mol. Biol.* 295:1009-1021; 2000.
- Buschmann T., Potapova O., Bar-Shira A., Ivanov V. N., Fuchs S. Y., Henderson S., Fried V. A., Minamoto T., Alarcon-Vargas D., Pincus M. R., Gaarde W. A., Holbrook N. J., Shiloh Y., Ronai Z. **Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress.** *Mol. Cell Biol.* 21:2743-2754 ; 2001.
- Bykov V. J., Issaeva N., Shilov A., Hultcrantz M., Pugacheva E., Chumakov P., Bergman J., Wiman K. G., Selivanova G. **Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound.** *Nat. Med.* 8:282-288; 2002.
- Cagnol S., Van Obberghen-Schilling E., Chambard J. C. **Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death.** *Apoptosis*. 11:337-346; 2006.
- Cao X., Deng X., May W. S. **Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax.** *Blood*. 102:2605-2614; 2003.
- Carrero P., Okamoto K., Coumailleau P., O'Brien S., Tanaka H., Poellinger L. **Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha.** *Mol. Cell. Biol.* 20:402-415; 2000.
- Cartron P. F., Arokium H., Oliver L., Meflah K., Manon S., Vallette F. M. **Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria.** *J. Biol. Chem.* 280:10587-10598; 2005.
- Cartron P. F., Oliver L., Martin S., Moreau C., LeCabellec M. T., Jezequel P., Meflah K., Vallette F. M. **The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients.** *Hum. Mol. Genet.* 11:675-687; 2002.

- Cecic I., Chan D. A., Sutphin P. D., Ray P., Gambhir S. S., Giaccia A. J., Graves E. E. **Oxygen sensitivity of reporter genes: implications for preclinical imaging of tumor hypoxia.** *Mol. Imaging.* 6:219-228; 2007.
- Chandel N. S., Vander Heiden M. G., Thompson C. B., Schumacker P. T. **Redox regulation of p53 during hypoxia.** *Oncogene.* 19:3840-3848; 2000.
- Chautan M., Chazal G., Cecconi F., Gruss P., Golstein P. **Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway.** *Curr. Biol.* 9:967-970; 1999.
- Chehab N.H., Malikzay A., Stavridi E. S., Halazonetis T. D. **Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:13777-13782; 1999.
- Chen D., Li M., Luo J., Gu W. **Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function.** *J. Biol. Chem.* 278:13595-13598; 2003.
- Chipuk J. E., Bouchier-Hayes L., Kuwana T., Newmeyer D. D., Green D. R. **PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53.** *Science.* 309:1732-1735; 2005.
- Chipuk J. E., Maurer U., Green D. R., Schuler M. **Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription.** *Cancer Cell.* 4:371-381; 2003.
- Clem R. J., Duckett C. S. **The IAP genes: unique arbitrators of cell death.** *Trends Cell. Biol.* 7:337-339; 1997.
- Clyne N., Hofman-Bang C., Haga Y., Hatori N., Marklund S. L., Pehrsson S. K., Wibom R. **Chronic cobalt exposure affects antioxidants and ATP production in rat myocardium.** *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 61:609-614; 2001.
- Codogno P., Meijer A. J. **Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death.** *Cell Death Differ.* 2:1509-1518; 2005.
- Comerford K. M., Wallace T. J., Karhausen J., Louis N. A., Montalto M. C., Colgan S. P. **Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene.** *Cancer Res.* 62:3387-3394; 2002.
- Corcoran C. A., Huang Y., Sheikh M. S. **The regulation of energy generating metabolic pathways by p53.** *Cancer Biol. Ther.* 5:1610-1613; 2006.
- Cory S., Adams J. M. **The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.** *Nat. Rev. Cancer.* 2:647-656; 2002.

- Crawford L. V., Pim D. C., Gurney E. G., Goodfellow P., Taylor-Papadimitriou J. **Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78:41-45; 1981.
- Cuenin S., Tinel A., Janssens S., Tschopp J. **p53-induced protein with a death domain (PIDD) isoforms differentially activate nuclear factor-kappaB and caspase-2 in response to genotoxic stress.** *Oncogene. In press*; 2007.
- Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S. A., Zamzami N., Kroemer G. **Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis.** *FEBS Lett.* 476:118-123; 2000.
- Degli E. M., Dive C. **Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:455-461; 2003.
- Degterev A., Boyce M., Yuan J. **A decade of caspases.** *Oncogene.* 22:8543-8567; 2003.
- Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G. D., Mitchison T. J., Moskowitz M. A., Yuan J. **Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.** *Nature Chemical Biology* 1:112-119; 2005.
- Deng C., Zhang P., Harper J. W., Elledge S. J., Leder P. **Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control.** *Cell.* 82:675-684; 1995
- Déry M. A., Michaud M. D., Richard D.E. **Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37:535-540; 2005.
- Desagher S., Martinou J. C. **Mitochondria as the central control point of apoptosis.** *Trends Cell Biol.* 10:369-377; 2000.
- Deveraux Q.L., Leo E., Stennicke H. R., Welsh K., Salvesen G. S., Reed J. C. **Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases.** *EMBO J.* 18:5242-5251; 1999.
- Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L., McArthur M. J., Montgomery C. A. Jr., Butel J. S., Bradley A. **Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours.** *Nature.* 356:215-221; 1992.
- Dridi W., Krabchi K., Gadjji M., Lavoie J., Bronsard M., Fetni R., Drouin R. **Activité dominante négative des protéines p53 mutées.** *Med. Sci.* 22:301-307 ; 2006.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.** *Cell.* 102:33-42; 2000.

- Duan H., Dixit V. M. **RAIDD is a new 'death' adaptor molecule.** *Nature.* 385:86-89; 1997.
- Dunn W. A. Jr. **Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation.** *Trends Cell Biol.* 4:139-143; 1994.
- Edinger A. L., Thompson C. B. **Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:663-669; 2004.
- Edsjö A., Holmquist L., Pählman S. **Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation.** *Semin. Cancer Biol.* 17:248-256; 2007.
- El-Deiry W. S. **p21/p53, cellular growth control and genomic integrity.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227:121-137; 1998.
- Eliyahu D., Michalovitz D., Eliyahu S., Pinhasi-Kimhi O., Oren M. **Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:8763-8767; 1990
- Eliyahu D., Michalovitz D., Eliyahu S., Pinhasi-Kimhi O., Oren M. **Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:8763-8767; 1989.
- Erster S., Mihara M., Kim R. H., Petrenko O., Moll U. M. **In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation.** *Mol. Cell. Biol.* 24:6728-6741; 2004.
- Fan T. J., Han L. H., Cong R. S., Liang J. **Caspase family proteases and apoptosis.** *Acta. Biochim. Biophys.* 37:719-727; 2005.
- Fels D. R., Koumenis C. **HIF-1 alpha and p53: the ODD couple?** *Trends Biochem. Sci.* 30: 426-429; 2005.
- Fraga M. F., Agrelo R., Esteller M. **Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1100:60-74; 2007
- Frappaz D., Michon J., Coze C., Berger C., Plouvier E., Lasset C., Bernard J. L., Stephan J. L., Bouffet E., Buclon M., Combaret V., Fourquet A., Philip T., Zucker J. M. **LCME3 treatment strategy: results in 99 consecutively diagnosed stage 4 neuroblastomas in children older than 1 year at diagnosis.** *J. Clin. Oncol.* 18:468-476; 2000.
- Freedman D. A., Wu L., Levine A. J. **Functions of the MDM2 oncoprotein.** *Cell Mol. Life Sci.* 55:96-107; 1999.
- Fuster J. J., Sanz-González S. M., Moll U. M., Andrés V. **Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy.** *Trends Mol. Med.* 13:192-199; 2007.

- Galluzzi L., Maiuri M. C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. **Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.** *Cell Death Differ.* 14:1237-1243 ; 2007.
- Garnett T. O., Filippova M., Duerksen-Hughes P. J. **Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells.** *Apoptosis.* 12:1299-1315; 2007.
- Geva-Zatorsky N., Rosenfeld N., Itzkovitz S., Milo R., Sigal A., Dekel E., Yarnitzky T., Liron Y., Polak P., Lahav G., Alon U. **Oscillations and variability in the p53 system.** *Mol. Syst. Biol.* 2:2006.2033; 2006
- Goda N., Dozier S. J., Johnson R. S. **HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression.** *Antioxid. Redox Signal.* 5:467-473; 2003.
- Goda N., Ryan H. E., Khadivi, B., McNulty W., Rickert R. C., Johnson R. S. **Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia.** *Mol. Cell Biol.* 23:359-369; 2003.
- Golubkov V.S., Chekanov A. V., Savinov A. Y., Rozanov D. V., Golubkova N. V0, Strongin A. Y. **Membrane type-1 matrix metalloproteinase confers aneuploidy and tumorigenicity on mammary epithelial cells.** *Cancer Res.* 66:10460-10465; 2006.
- González-Polo R. A., Boya P., Pauleau A. L., Jalil A., Larochette N., Souquère S., Eskelinen E. L., Pierron G., Saftig P., Kroemer G. **The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death.** *J. Cell. Sci.* 118(Pt 14):3091-3102; 2005.
- Greco O., Scott S. **Tumor hypoxia and targeted gene therapy.** *Int. Rev. Cytol.* 257:181-212; 2007.
- Guo M., Song L. P., Jiang Y., Liu W., Yu Y., Chen G. Q. **Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms.** *Apoptosis.* 11:67-77; 2005.
- Häcker G., Weber A. **BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?** *Arch. Biochem. Biophys.* 462:150-155; 2007.
- Hahn W. C., Counter C. M., Lundberg A. S., Beijersbergen R. L., Brooks M. W., Weinberg R. A. **Creation of human tumour cells with defined genetic elements.** *Nature.* 400:464-468 ; 1999
- Hammond E. M., Denko N. C., Dorie M. J., Abraham R. T., Giaccia A. J. **Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest.** *Mol. Cell Biol.* 22:1834-1843; 2002.

- Hammond E. M., Giaccia A. J. **The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331:718-725; 2005.
- Hammond E. M., Mandell D. J., Salim A., Krieg A. J., Johnson T. M., Shirazi H. A., Attardi L. D., Giaccia A. J. **Genome-wide analysis of p53 under hypoxic conditions.** *Mol. Cell. Biol.* 26:3492-3504; 2006.
- Hansson L. O., Friedler A., Freund S., Rudiger S., Fersht A. R. **Two sequence motifs from HIF-1 alpha bind to the DNA-binding site of p53.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:10305-10309; 2002.
- Harding T. M., Hefner-Gravink A., Thumm M., Klionsky D. J. **Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway.** *J. Biol. Chem.* 271:17621-17624; 1996.
- Harper D. M., Franco E. L., Wheeler C., Ferris D. G., Jenkins D., Schuind A., Zahaf T., Innis B., Naud P., De Carvalho N. S. **Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled.** *The Lancet* 367:1247-1255; 2006.
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. **Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.** *Nature.* 387:296-299; 1997.
- Hill M. M., Adrain C., Martin S. J. **Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows.** *Mol. Interv.* 3:19-26; 2003.
- Houghton J., Morozov A., Smirnova I., Wang TC. **Stem cells and cancer.** *Semin. Cancer Biol.* 17:191-203; 2007
- Huang D. C., Adams J. M., Cory S. **The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4.** *EMBO J.* 17:1029-1039; 1998.
- Hunter A. M., Lacasse E. C., Korneluk R. G. **The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets.** *Apoptosis.* 12:1543-1568; 2007.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J. M., Lane W. S., Kaelin W. G. Jr. **HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing.** *Science.* 292:464-468; 2001.
- Jögi A., Øra I., Nilsson H., Poellinger L., Axelson H., Pählman S. **Hypoxia-induced dedifferentiation in neuroblastoma cells.** *Cancer Lett.* 197:145-150; 2003.
- Jones R. G., Plas D. R., Kubek S., Buzzai M., Mu J., Xu Y., Birnbaum M. J., Thompson C. B. **AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint.** *Mol. Cell.* 18:283-293; 2005.

- Juliano R. L., Ling V. **A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.** *Biochim. Biophys. Acta.* 455:152-162; 1976.
- Jung J. Y., Kim W. J. **Involvement of mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism in CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis of rat PC12 cells** *Neurosci. Lett.* 371:85-90; 2004.
- Jung J. Y., Mo H. C., Yang K. H., Jeong Y. J., Yoo H. G., Choi N. K., Oh W. M., Oh H. K., Kim S. H., Lee J. H., Kim H. J., Kim W. J. **Inhibition by epigallocatechin gallate of CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis in rat PC12 cells.** *Life Sci.* 80:1355-1363; 2007.
- Kaelin W. G. Jr. **How oxygen makes its presence felt.** *Genes Dev.* 16:1441-1445; 2002.
- Kamer I., Sarig R., Zaltsman Y., Niv H., Oberkovitz G., Regev L., Haimovich G., Lerenthal Y., Marcellus R. C., Gross A. **Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response.** *Cell.* 122:593-603; 2005.
- Karovic O., Tonazzini I., Rebola N., Edström E., Lövdahl C., Fredholm B.B., Daré E. **Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1alpha.** *Biochem. Pharmacol.* 73:694-708; 2007.
- Keshelava N., Zuo J. J., Chen P., Waidyaratne S. N., Luna M. C., Gomer C. J., Triche T. J., Reynolds C. P. **Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines.** *Cancer Res.* 61(16):6185-6193, 2001.
- Kilic M., Kasperczyk H., Fulda S., Debatin K. M. **Role of hypoxia inductible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance.** *Oncogene.* 26:2027-2038; 2007.
- Kim B. M., Chung H. W. **Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS-mediated caspase-8/Bid/Bax pathway in human lymphocytes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363:745-750; 2007.
- Kirsch D.G., Kastan M.B. **Tumor suppressor p53: implications for tumor development and prognosis.** *J. Clin. Oncol.* 16:3158-3168; 1998.
- Klein G. **The approaching era of the tumor suppressor genes.** *Science.* 238:1539-1545; 1987.
- Korsmeyer S. J., Shutter J. R., Veis D. J., Merry D. E., Oltvai Z. N. **Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death.** *Semin. Cancer Biol.* 4:327-332; 1993.
- Koumenis C., Alarcon R., Hammond E., Sutphin P., Hoffman W., Murphy M., Derr J., Taya Y., Lowe S. W., Kastan M., Giaccia A. **Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation.** *Mol. Cell. Biol.* 21:1297-1310; 2001.

- Krantic S., Mechawar N., Reix S., Quirion R. **Apoptosis-inducing factor: a matter of neuron life and death.** *Prog. Neurobiol.* 81:179-96; 2007.
- Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. **Mitochondrial membrane permeabilization in cell death.** *Physiol. Rev.* 87:99-163; 2007.
- Lahav G., Rosenfeld N., Sigal A., Geva-Zatorsky N., Levine A. J., Elowitz M. B., Alon U. **Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells.** *Nat. Genet.* 36:147-150; 2004.
- Lai P. B., Chi T. Y., Chen G. G. **Different level of p53 induced either apoptosis or cell cycle arrest in a doxycycline-regulated hepatocellular carcinoma cell line in vitro.** *Apoptosis.* 12:387-393; 2007.
- Land H., Parada L. F., Weinberg R. A. **Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis.** *Science.* 222:771-778; 1983.
- Lane D. P., Benichmol S. **p53: oncogene or anti-oncogene?** *Genes Dev.* 4:1-8; 1990.
- Larsen C. J. **The BCL2 gene, prototype of a gene family that controls programmed cell death (apoptosis).** *Ann. Genet.* 37:121-134; 1994.
- Leblanc V., May P. **Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN.** *Med. Sci.* 18:577-584 ; 2002.
- Lee C. N., Cheng W. F., Chang M. C., Su Y. N., Chen C. A., Hsieh F. J. **Hypoxia-induced apoptosis in endothelial cells and embryonic stem cells.** *Apoptosis.* 10:887-894; 2005.
- Leu J. I., Dumont P., Hafey M.; Murphy M. E.; George D. L. **Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl-1 complex.** *Nat. Cell. Biol.* 6:443-450; 2004.
- Lev Bar-Or R., Maya R., Segel L. A., Alon U., Levine A. J., Oren M. **Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:11250-11255; 2000.
- Levine A. J., Hu W., Feng Z. **The p53 pathway: what questions remain to be explored ?** *Cell. Death Differ.* 13:1027-1036 ; 2006.
- Levine A.J. **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell.* 88:323-331; 1997.
- Levine B., Yuan J. **Autophagy in cell death: an innocent convict?** *J. Clin. Invest.* 115:2679-2688; 2005.
- Lin C. F., Chen C. L., Chang W. T., Jan M. S., Hsu L. J., Wu R. H., Tang M. J., Chang W. C., Lin Y. S. **Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria**

- during ceramide and etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279:40755-40761; 2004.
- Lin T., Chao C., Saito S., Mazur S. J., Murphy M. E., Appella E., Xu Y. **p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression.** *Nat. Cell Biol.* 7:165-171; 2005.
- Lipton S. A, Bossy-Wetzel E.. **Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity.** *Cell.* 111:147-150; 2002.
- Londoño-Vallejo J. A. **Telomere instability and cancer.** *Biochimie.* In Press ; 2007.
- Lorenzo H. K., Susin S. A., Penninger J., Kroemer G. **Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death.** *Cell. Death Differ.* 6:516-524; 1996.
- Lowe S. W., Cepero E., Evan G. **Intrinsic tumour suppression.** *Nature.* 432:307-315; 2004.
- Lüthi A. U., Martin S. J. **The CASBAH: a searchable database of caspase substrates.** *Cell Death Differ.* 14:641-650; 2007.
- Luo Y., He D. L., Ning L., Shen S. L., Li L., Li X., Zhau H. E., Chung L.W. **Over-expression of hypoxia-inducible factor-1alpha increases the invasive potency of LNCaP cells in vitro.** *BJU. Int.* 98:1315-1219; 2006.
- Mabjeesh N. J., Amir S. **Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis.** *Histo. Histopathol.* 22:559-572; 2007.
- Maestro R., Dei Tos A. P., Hamamori Y., Krasnokutsky S., Sartorelli V., Kedes L., Doglioni C., Beach D. H., Hannon G. J. **Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis.** *Genes Dev.* 13:2207-2217; 1999
- Maiuri M. C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. **Self-eating and self-killing : crosstalk between autophagy and apoptosis.** *Mol. Cell. Biol.* 8:741-752; 2007.
- Makin G. W., Corfe B. M., Griffiths G. J., Thistlethwaite A., Hickman J. A., Dive C. **Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate.** *EMBO. J.* 20:6306-6315; 2001.
- Malissein E., Verdier M., Ratinaud M. H., Troutaud D. **Changes in bad phosphorylation are correlated with BCR-induced apoptosis of WEHI-231 immature B cells.** *Biochimie.* 85:733-740; 2003.
- Marchetti P. **Apoptosis: basic knowledge and applications.** *Gynecol. Obstet. Fertil.* 33:632-641; 2005.

- Maris J. M., Hogarty M. D., Bagatell R., Cohn S. L. **Neuroblastoma.** *The Lancet.* 369:2106-2120; 2007.
- Martínez-Sánchez G., Giuliani A. **Cellular redox status regulates hypoxia inducible factor-1 activity. Role in tumour development.** *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 26:39-50; 2007.
- Matoba S., Kang J. G., Patino W. D., Wragg A., Boehm M., Gavriloova O., Hurley P. J., Bunz F., Hwang P. M. **p53 regulates mitochondrial respiration.** *Science.* 312:1650-1653; 2006.
- McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Wong E. W., Chang F., Lehmann B., Terrian D. M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A. M., Franklin R.A. **Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1773:1263-1284; 2007.
- Meijer A. J., Codogno P. **Regulation and role of autophagy in mammalian cells.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:2445-2462; 2004.
- Melino G. **p73, the "assistant" guardian of the genome ?** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010:9-15; 2003.
- Melino G., Knight R. A., Nicotera P. **How many ways to die? How many different models of cell death?** *Cell Death Differ.* 2:1457-1462; 2005.
- Menéndez S., Higgins M., Berkson R. G., Edling C., Lane D. P., Laín S. **Nuclear export inhibitor leptomycin B induces the appearance of novel forms of human Mdm2 protein.** *Br. J. Cancer.* 88:636-643; 2003.
- Mikami M., Sadahira Y., Haga A., Otsuki T., Wada H., Sugihara T. **Hypoxia-inducible factor-1 drives the motility of the erythroid progenitor cell line, UT-7/Epo, via autocrine motility factor.** *Exp. Hematol.* 33:531-541; 2005.
- Minamoto T., Buschmann T., Habelhah H., Matusевич E., Tahara H., Boerresen-Dale A. L., Harris C., Sidransky D., Ronai Z. **Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors.** *Oncogene.* 20:3341-3347 ; 2001.
- Mishra O. P., Randis T., Ashraf Q. M., Delivoria-Papadopoulos M. **Hypoxia-induced Bax and Bcl-2 protein expression, caspase-9 activation, DNA fragmentation, and lipid peroxidation in mitochondria of the cerebral cortex of newborn piglets: the role of nitric oxide.** *Neuroscience.* 141:1339-1349; 2006.

- Mitsios N., Gaffney J., Krupinski J., Mathias R., Wang Q., Hayward S., Rubio F., Kumar P., Kumar S., Slevin M. **Expression of signaling molecules associated with apoptosis in human ischemic stroke tissue.** *Cell Biochem. Biophys.* 47:73-86; 2007.
- Miyashita T., Reed J. C. **Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.** *Cell.* 80:293-299; 1995.
- Mizushima N., Klionsky D. J. **Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism.** *Annu. Rev. Nutr.* 27:19-40; 2007.
- Moll U. M., Slade N. **p63 and p73: roles in development and tumor formation.** *Mol. Cancer Res.* 2:371-386; 2004.
- Müller M., Schleithoff E. S., Stremmel W., Melino G., Krammer P. H., Schilling T. **One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity.** *Drug Resist. Updat.* 9:288-306; 2007
- Muntoni A., Reddel R. R. **The first molecular details of ALT in human tumor cells.** *Hum. Mol. Genet.* 2:R191-196; 2005
- Nicotera P., Melino G. **Caspase-14 and epidermis maturation.** *Nat. Cell. Biol.* 9:621-622; 2007.
- Ninane J., Pearson A. D. **Neuroblastoma, Paediatric Oncology Clinical Practice and Controversies.** *Medical and Pediatric Oncology* Ed. 2: 443-483. London: Chapman and Hall Medical; 1997.
- Nomura M., Shimizu S., Sugiyama T., Narita M., Ito T., Matsuda H., Tsujimoto Y. **14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax.** *J. Biol. Chem.* 278:2058-2065; 2003.
- O'Brate A., Giannakakou P. **The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code ?** *Drug Resist. Updat.* 29:313-322; 2003.
- Okazaki K., Maltepe E. **Oxygen, epigenetics and stem cell fate.** *Regen. Med.* 1:71-83; 2006.
- Okuda M. **A multidisciplinary overview of cardiogenic shock.** *Shock.* 25:557-570; 2006.
- Olsson A., Manzl C., Strasser A., Villunger A. **How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression?** *Cell. Death Differ.* 14:1561-1575; 2007.
- Olsson A., Manzl C., Strasser A., Villunger A. **How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression?** *Cell Death Differ.* 14:1561-1575; 2007.
- Oren M. **The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties.** *Biochim. Biophys. Acta.* 823:67-78; 1985.

- Ostermeyer A. G., Runko E., Winkfield B., Ahn B., Moll U. M. **Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93:15190-15194; 1996.
- Ostrakhovitch E. A., Cherian M. G. **Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells.** *Apoptosis.* 10:111-121. 2005.
- Pan Y., Oprysko P. R., Asham A. M., Koch C. J., Simon M. C. **p53 cannot be induced by hypoxia alone but responds to the hypoxic microenvironment.** *Oncogene.* 23:4975-4983; 2004.
- Park B. S., Song Y. S., Yee S. B., Lee B. G., Seo S. Y., Park Y. C., Kim J. M., Kim H. M., Yoo Y. H. **Phospho-ser15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis.** *Apoptosis* 10:193-200; 2005.
- Pattingre S., Espert L., Biard-Piechaczyk M., Codogno P. **Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes.** *Biochimie. In press;* 2007.
- Pekova S., Cmejla R., Smolej L., Kozak T., Spacek M., Prucha M. **Identification of a novel, transactivation-defective splicing variant of p53 gene in patients with chronic lymphocytic leukemia.** *Leuk. Res.* In press; 2007.
- Peng C. Y., Graves P. R., Thoma R. S., Wu Z., Shaw A. S., Piwnica-Worms H. **Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216.** *Science.* 277:1501-1505; 1997.
- Puthalakath H., Strasser A. **Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins.** *Cell Death Differ.* 9:505-512; 2002.
- Qin H., Yu T., Qing T., Liu Y., Zhao Y., Cai J., Li J., Song Z., Qu X., Zhou P., Wu J., Ding M., Deng H. **Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells.** *J. Biol. Chem.* 282:5842-5852; 2007.
- Ramírez-Bergeron D. L., Runge A., Adelman D. M., Gohil M., Simon M.C. **HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature.** *Dev. Cell.* 11:81-92; 2006.
- Rando T. A. **The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction.** *Cell.* 129:1239-1243; 2007.
- Rasola A., Bernardi P. **The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis.** *Apoptosis.* 12:815-833; 2007.

- Ratcliffe P.J. **HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia?** *J. Clin. Invest.* 117:862-865; 2007.
- Riedl S. J., Shi Y. **Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:897-907; 2004.
- Rohaly G., Chemnitz J., Dehde S., Nunez A. M., Heukeshoven J., Deppert W., Dornreiter I. **A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint.** *Cell.* 122:21-32; 2005.
- Rosati M., Raimondi C., Di Seri M. **Hypoxia-induced p21<sup>waf</sup> and p27 regulation in c-myc immortalized cells.** *J. Clin. Oncol.*, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 25:No.18S (June 20 Supplement); 2007.
- Rupinder S. K., Gurpreet A. K., Manjeet S. **Cell suicide and caspases.** *Vascul. Pharmacol.* 46:383-393; 2006
- Ruscetti F. W., Akel S., Bartelmez S. H. **Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context.** *Oncogene.* 24:5751-5763; 2005.
- Ryan J. J., Prochownik E., Gottlieb C. A., Apel I. J., Merino R., Nuñez G., Clarke M. F. **c-myc and Bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91:5878-5882; 1994.
- Saito S., Yamaguchi H., Higashimoto Y., Chao C., Xu Y., Fornace A. J., Appella E., Anderson C. W. **Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress.** *J. Biol. Chem.* 278:37536-37544; 2003.
- Sano M., Minamino T., Toko H., Miyauchi H., Orimo M., Qin Y., Akazawa H., Tateno K., Kayama Y., Harada M., Shimizu I., Asahara T., Hamada H., Tomita S., Molkentin J. D., Zou Y., Komuro I. **p53-induced inhibition of HIF-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload.** *Nature.* 446:444-448; 2007.
- Sansome C., Zaika A., Marchenko N. D., Moll U. M. **Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria.** *FEBS letters.* 488:110-115; 2001.
- Satyamoorthy K., Chehab N. H., Waterman M. J., Lien M. C., El-Deiry W. S., Herlyn M., Halazonetis T. D. **Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells.** *Cell Growth Differ.* 11:467-474; 2000.
- Scheffner M. **Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation.** *Pharmacol. Ther.* 78:129-139; 1998.

- Schmid T., Zhou J., Brüne B. **HIF-1 and p53 : communication of transcription factors under hypoxia.** *J. Cell. Mol. Med.* 8:423-431; 2004.
- Schmid T., Zhou J., Köhl R., Brüne B. **p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).** *Biochem. J.* 380:289-295; 2004.
- Scorrano L., Korsmeyer S. J. **Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:437-444; 2003.
- Shchors K., Evan G. **Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer?** *Cancer Res.* 67:7059-7061; 2007.
- Shi Y. **Mechanical aspects of apoptosome assembly.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:677-684; 2006.
- Shin D. H., Kim J. H., Jung Y. J., Kim K. E., Jeong J. M., Chun Y. S., Park J. W. **Preclinical evaluation of YC-1, a HIF inhibitor, for the prevention of tumor spreading.** *Cancer Lett.* 255:107-116; 2007.
- Shyu K. G., Hsu F. L., Wang M. J., Wang B. W., Lin S. **Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates lung adenocarcinoma cell invasion.** *Exp. Cell. Res.* 313:1181-1191; 2007.
- Sionov R. V., Haupt Y. **The cellular response to p53: the decision between life and death.** *Oncogene.* 18:6145-6157; 1999.
- Slee E.A., O'Connor D. J., Lu X. **To die or not to die: how does p53 decide?** *Oncogene.* 23:2809-2818; 2004.
- Speidel D., Helmbold H., Deppert W. **Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress.** *Oncogene.* 25:940-953; 2006.
- Stasinopoulos I. A., Mironchik Y., Raman A., Wildes F., Winnard P. Jr., Raman V. **HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells.** *J. Biol. Chem.* 280 :2294-2299; 2005.
- Stenger C., Naves T., Jauberteau M. O., Verdier M., Ratinaud M. H. **The spatio-temporal apoptotic response to a hypoxia-mimetic drug (CoCl<sub>2</sub>) in two neuroblastoma cell lines is depending on p53 status.** *Soumis*; 2007.
- Strasser A., Huang D. C., Vaux D. L. **The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1333:F151-178; 1997.
- Strasser A., **The role of BH3-only proteins in the immune system.** *Nat. Rev. Immunol.* 5:189-200; 2005.

- Strom E., Sathe S., Komarov P. G., Chernova O. B., Pavlovska I., Shyshynova I., Bosykh D. A., Burdelya L. G., Macklis R. M., Skaliter R., Komarova E. A., Gudkov A. V. **Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation.** *Nat. Chem. Biol.* 2:474-479; 2006.
- Susin S. A., Dugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K. F., Irinopoulou T., Prévost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W. C., Kroemer G. **Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis.** *J. Exp. Med.* 192:571-580; 2000.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M., Kroemer G. **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.** *Nature.* 397:441-446; 1999.
- Takagi M., Absalon M. J., McLure K. G., Kastan M. B. **Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin.** *Cell.* 123:49-63; 2005
- Tanaka H., Yamamoto M., Hashimoto N., Miyakoshi M., Tamakawa S., Yoshie M., Tokusashi Y., Yokoyama K., Yaginuma Y., Ogawa K. **Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha as an early change in mouse hepatocarcinogenesis.** *Cancer Res.* 66:11263-11270; 2006.
- Tang D., Lahti J. M., Kidd V. J. **Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 275:9303-9307; 2000.
- Teodori E., Dei S., Martelli C., Scapecchi S., Gualtieri F. **The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR).** *Curr. Drug. Targets.* 7:893-909; 2006.
- Thompson T., Tovar C., Yang H., Carvajal D., Vu B. T., Xu Q., Wahl G. M., Heimbrook D. C., Vassilev L. T. **Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 279:53015-53022; 2004.
- Thoreen C. C., Sabatini D.M. **AMPK and p53 help cells through lean times.** *Cell Metab.* 1:287-288; 2005.
- Tinel A., Janssens S., Lippens S., Cuenin S., Logette E., Jaccard B., Quadroni M., Tschopp J. **Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway.** *EMBO J.* 26:197-208; 2007.

- Toledo F., Wahl G. M. **Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas.** *Nat. Rev. Cancer.* 6:909-923; 2006.
- Tomita Y., Marchenko N., Erster S., Nemaierova A., Dehner A., Klein C., Pan H., Kessler H., Pancoska P., and Moll U. M. **WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization.** *J. Biol. Chem.* 281:8600-8606; 2006.
- Toyota H., Yanase N., Yoshimoto T., Moriyama M., Sudo T., Mizuguchi J. **Calpain-induced Bax-cleavage product is a more potent inducer of apoptotic cell death than wild-type Bax.** *Cancer Lett.* 189:221-230; 2003.
- Tsukada M., Ohsumi Y. **Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS Lett.* 333:169-174; 1993.
- Tweddle D. A., Malcolm A. J., Bown N., Pearson A. D., Lunec J. **Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line.** *Cancer Res.* 61:8-13; 2001.
- Tweddle D. A., Pearson A. D., Haber M., Norris M. D., Xue C., Flemming C., Lunec J. **The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma.** *Cancer Lett.* 197:93-98; 2003.
- Tyzio R., Cossart R., Khalilov I., Minlebaev M., Hübner C. A., Represa A., Ben-Ari Y., Khazipov R. **Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery.** *Science.* 314:1788-1792; 2006.
- Vakifahmetoglu H., Olsson M., Orrenius S., Zhivotovsky B. **Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage.** *Oncogene.* 25:5683-5692; 2006.
- Valsesia-Wittmann S., Magdeleine M., Dupasquier S., Garin E., Jallas A. C., Combaret V., Krause A., Leissner P., Puisieux A. **Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells.** *Cancer Cell.* 6:625-630; 2004.
- Vousden K. H. **p53 and PUMA: a deadly duo.** *Science.* 309:1685-1686; 2005.
- Vousden K. H., Lu X. **Live or let die: the cell's response to p53.** *Nat. Rev. Cancer.* 2:594-604; 2002.
- Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillman B. **The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.** *Nature.* 369:574-578; 1994.
- Waga S., Li R., Stillman B. **p53-induced p21 controls DNA replication.** *Leukemia.* 3:321-323; 1997.
- Warburg O. **The metabolism of tumors.** *London : Arnold Constable ;* 1930.

- Weinmann M., Jendrossek V., Handrick R., Güner D., Goecke B., Belka C. **Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner.** *Oncogene*. 23:3757-3769; 2004.
- Wieder T., Essmann F., Prokop A., Schmelz K., Schulze-Osthoff K., Beyaert R., Dörken B., Daniel P. T. **Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3.** *Blood*. 97:1378-1387; 2001.
- Wilson A. S., Power B. E., Molloy P. L. **DNA hypomethylation and human diseases.** *Biochim. Biophys. Acta*. 1775:138-162; 2007.
- Wilson G. D. **Hypoxia and prognosis: the oxygen tension mounts.** *Front. Biosci.*12:3502-3618; 2007.
- Wood D. E., Newcomb E. W. **Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis.** *J. Biol. Chem.* 274:8309-83015; 1999.
- Wu B., Qiu W., Wang P., Yu H., Cheng T., Zambetti G. P., Zhang L., Yu J. **p53 independent induction of PUMA mediates intestinal apoptosis in response to ischaemia-reperfusion.** *Gut*. 56:645-654; 2007.
- Xu Y., Kim S. O., Li Y., Han J. **Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death.** *J. Biol. Chem.* 281:19179-19187; 2006.
- Yee K. S., Vousden K. H. **Complicating the complexity of p53.** *Carcinogenesis*. 26:1317-1322; 2005.
- Yin Z., Haynie J., Yang X., Han B., Kiatchoosakun S., Restivo J., Yuan S., Prabhakar N. R., Herrup K., Conlon R. A., Hoit B. D., Watanabe M., Yang Y. C. **The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 99:10488-10493; 2002.
- Yoon G., Kim H. J., Yoon Y. S., Cho H., Lim I. K., Lee J. H. **Iron chelation-induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: association of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1)-mediated p27Kip1 expression.** *Biochem. J.* 366:613-621; 2002.
- Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Kinzler K. W., Vogelstein B. **PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells.** *Mol Cell*. 7:673-82; 2001.
- Yu Z. K., Geyer R. K., Maki C. G. **MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic p53.** *Oncogene*. 19:5892-5897; 2000.

- Zagórska A., Dulak J. **HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing.** *Acta. Biochim. Pol.* 51:563-585; 2004.
- Zeng Y. X., el-Deiry W. S. **Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways.** *Oncogene.* 12:1557-1564; 1996.
- Zinkel S., Gross A., Yang E. **Bcl2 family in DNA damage and cell cycle control.** *Cell Death Differ.* 13:1351-1359; 2006.
- Zou W., Yan M., Xu W., Huo H., Sun L., Zheng Z., Liu X. **Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation.** *J. Neurosci. Res.* 64:646-653; 2001.

## **ANNEXES**

## Article III

### **Mitochondrial localization and activity of P-glycoprotein in doxorubicin-resistant K562 cells.**

**Munteanu E, Verdier M, Grandjean-Forestier F, Stenger C, Jayat-Vignoles C, Huet S, Robert J, Ratinaud MH.**

Lab. Physiologie Mitochondriale EA 3842 – Faculté de Médecine 87025 Limoges, France

#### **ABSTRACT :**

It is now well-established that P-glycoprotein 170 (P-gp), an efflux pump involved in multidrug resistance (MDR) is overexpressed at the plasma membrane of doxorubicin-resistant K562 leukemia cells. Nevertheless, several results suggested: (i) that P-gp-mediated drug efflux was not the only mechanism involved in resistance; (ii) that intracellular compartments could accumulate the drug, preventing it from reaching its nuclear targets; (iii) that agents able to reverse multidrug resistance may lead to intracellular drug redistribution. We have studied the localization of P-gp in mitochondria as well as its functional properties in this compartment. Using several monoclonal antibodies (MoAbs) directed against different P-gp epitopes, a protein was detected in the cytoplasm of two doxorubicin-resistant K562 sublines and, by confocal laser scanning microscopy, this protein was shown to co-localize in the Golgi apparatus and in mitochondria, in equivalent proportions. Purified mitochondria were isolated from K562 cell variants; the presence of a protein of about 170 kDa and reacting with several anti-P-gp antibodies was assessed in MDR cells by Western blotting and flow cytometry. Functional assays have shown that mitochondrial P-gp was involved in doxorubicin accumulation inside the organelle but not in its efflux, suggesting an orientation of P-gp in the mitochondrial membrane inverse to that observed in the plasma membrane. A potential role for mitochondrial P-gp in MDR cells would be to protect the nucleus from doxorubicin. This is the first demonstration of the presence and functional activity of P-gp in mitochondria of MDR cells.

# POSTER I

## A functional P-Glycoprotein in mitochondria of K562 cells

**Christophe STENGER<sup>1</sup>, Eliza MUNTEANU<sup>1</sup>, F GRANDJEAN-FORESTIER<sup>1</sup>, Jacques ROBERT<sup>2</sup>, Mireille VERDIER<sup>1</sup>, Marie-Hélène RATINAUD<sup>1</sup>**

1-EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies-Faculté de Médecine, 87025 Limoges, France, 2-Institut Bergonié, 33076 Bordeaux, France

### **ABSTRACT:**

It is now well established that P-glycoprotein 170 (P-gp), an efflux pump involved in multidrug resistance (MDR) is overexpressed at the plasma membrane of doxorubicin-resistant K562 leukemia cells. We have studied the localization of P-gp in mitochondria as well as its functional properties in this compartment. Using several monoclonal antibodies directed against different P-gp epitopes, a protein was detected in the cytoplasm of two doxorubicin-resistant K562 sublines and, by confocal laser scanning microscopy in mitochondria. Purified mitochondria were isolated from K562 cell variants; the presence of a protein of about 170 kDa and reacting with several anti-P-gp antibodies was assessed in MDR cells by Western blotting and flow cytometry. Functional assays have shown that mitochondrial P-gp was involved in doxorubicin accumulation inside the organelle but not in its efflux, suggesting an orientation of P-gp in the mitochondrial membrane inverse to that observed in the plasma membrane. A potential role for mitochondrial P-gp in MDR cells would be to protect the nucleus from doxorubicin. This is the first demonstration of the presence and functional activity of P-gp in mitochondria of MDR cells.

## POSTER II

### **Expression of neurotrophins and related receptors in human B cell lines. Evidence for their induction by serum deprivation and Fas activation.**

AL Fauchais<sup>1,2</sup>, C Stenger<sup>1</sup>, L Domballe<sup>1</sup>, D Troutaud<sup>1</sup>, E Vidal<sup>1,2</sup>, MO Jauberteau<sup>1,3</sup>

1. EA3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies, Faculté de Médecine 87000 Limoges 2 Service de Médecine Interne A, 3 Laboratoire d'Immunologie, CHU Dupuytren Limoges

#### **ABSTRACT**

In order to study cellular expression of neurotrophins (NT) and their related receptors in B cell maturation, NGF, BDNF, NT3, TrkA, TrkB, TrkC and p75NTR expression were investigated in a panel of immortalized lymphoblastoid cell lines [proB (RS4), pre B (Nalm6), mature B cells (BL2) and plasmocytes (U266)] by flow cytometry, immunocytochemistry and western blotting.

Our data showed that all Trk and p75NTR are both present in resting cell lines with a prominent intra cytoplasmic sequestration, remarkably conserved during B cell maturation. In contrast, only TrkB receptor was expressed on the membrane, of lesser than 20% of cells, whatever the stage of maturation. Interestingly, TrkC cytoplasmic expression enhanced with differentiation, expressed in 20 % of pro-B cells, to more than 80 % in U266 cells. The production of all NT was unchanged on B cell maturation and concerned more than 80% of cells.

After a 3-day serum deprivation and / or a 24-hr exposure to agonistic anti-Fas Mab, all cell lines were characterized by an increase of membranous expression of TrkA, TrkB receptors and p75NTR, with maximal expression in mature B cells. Although, NGF and BDNF production was enhanced in stressed conditions especially in U266, NT3 production was dramatically reduced by serum deprivation and restored by anti-Fas activating mAb. In stressed conditions, BDNF-producing cells were characterized by a capping of TrkB receptors in the membrane, explained by an autocrine secretion induced by serum withdrawal.

Studies of apoptosis in all these conditions needed to be investigated to determine the function of this potential autocrine regulation in B cell lines.

## POSTER III

### **The spatio-temporal apoptotic response to a hypoxia-mimetic drug: CoCl<sub>2</sub> in two neuroblastoma cell lines is depending on p53 status.**

**Christophe STENGER, Thomas NAVES, Marie-Odile Jauberteau, Mireille VERDIER and Marie-Hélène RATINAUD.**

Lab. Physiologie Mitochondriale EA 3842 – Faculté de Médecine 87025 Limoges, France

#### **ABSTRACT :**

During hypoxia, it has been shown that p53 is upregulated and induces a mitochondrial apoptosis. Cobalt Chloride (CoCl<sub>2</sub>), a hypoxia-mimetic agent, leads to stabilization of the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1 $\alpha$ ) protein, and p53 accumulation. Divergent data reports about the exact p53 implication in CoCl<sub>2</sub> cell death. Hence, we investigated the CoCl<sub>2</sub> effects on neuroblastoma cell lines carrying, a wild-type p53 (*SHSY5Y*), and a mutated-DNA-binding domain p53 (*SKNBE(2c)*). After analysing CoCl<sub>2</sub>-induced mitochondrial apoptosis pathway on both cell lines (i.e. Bax expression and  $\Delta\Psi_m$  collapse), we focused on events related to p53-dependent pathways. Basal p53 expression in control *SHSY5Y* cells increased under CoCl<sub>2</sub> treatment, reaching a strong signal at 6 h then decreased progressively until 24 h. In opposite, p53 was detected at a high level in no-treated *SKNBE(2c)* cells, and was significantly abolished in a time-dependent manner. In *SHSY5Y* cells p53 serine 15 phosphorylation appeared early (6 h) located onto mitochondria, on the contrary *SKNBE(2c)* cells did not exhibit phosphorylation at this residue. In both cell lines, threonine 81-phosphorylated p53 was later detected (12 h) in nucleus. We demonstrated that CoCl<sub>2</sub> induces apoptosis in neuroblastoma cell lines via p53 in a time-dependent manner according to their subcellular localization and sequential p53 phosphorylation pattern.

## POSTER IV

### **A down-regulation of p53 induced the recruitment of an alternative cell death pathway in neuroblastoma cell line after hypoxia mimetic drug cobalt chloride treatment.**

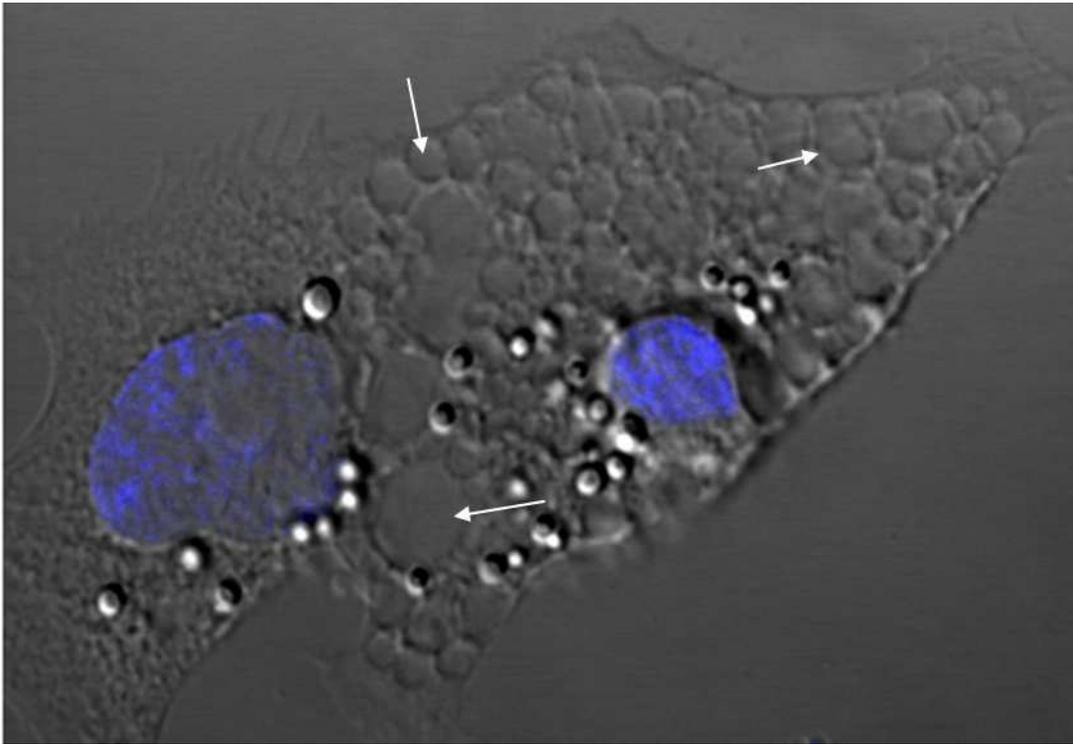
**Christophe STENGER<sup>1</sup>, Thomas NAVES<sup>1</sup>, Marie-Odile JAUBERTEAU<sup>1</sup>, Mireille VERDIER<sup>1</sup>, Marie-Hélène RATINAUD<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> : EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies - Faculté de Médecine, 87025 Limoges, France, France

#### **ABSTRACT**

Neuroblastoma, as many others solid tumor, presents hypoxia areas due to extreme tumor growth. Such hypoxic stress triggers activation of a specific cellular adaptative metabolism through the stabilization of the Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  subunit (HIF-1 $\alpha$ ). Cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) is commonly used as a hypoxia-mimetic agent to induce HIF-1 $\alpha$  stabilization. Divergent data concerning p53 implication in CoCl<sub>2</sub>-induced cell death exist. Following treatment of neuroblastoma *SHSY5Y* cells (p53 wt) by CoCl<sub>2</sub>, we reported in a previous study, an apoptosis through a mitochondrial-dependent pathway involving p53 translocation to mitochondria. In our present study, we down-regulated p53 expression by RNAi and monitored CoCl<sub>2</sub>-induced cell death. After transfections and CoCl<sub>2</sub> treatments, we observed cell death without p53 expression. As expected, p53 targeted proteins, such as p21 and Bax, were not up-regulated. Nevertheless, a mitochondrial membrane potential collapse and a caspase-3 activation appeared later. CoCl<sub>2</sub>-induced apoptosis was triggered by caspase-8 activation, tBid mitochondrial translocation, indicating recruitment of cell death receptor pathway regulators. Our results suggest that p53 is the central molecular actor of the apoptotic response in *SHSY5Y* following a hypoxia-like stress and that its lack activates an alternative cell death pathway.

## **Vacuolisation du cytoplasme dans une cellule *SKNBE(2c)* après 24 h de traitement au $\text{CoCl}_2$**



**Les flèches indiquent les vacuoles autophagiques, les noyaux sont marqués au TOPRO-3 (bleu).**