

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Sciences – Technologie – Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

UMR CNRS 6101 :

« Physiologie moléculaire de la réponse immune et des
lymphoproliférations »

Groupe « Mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse »

Laboratoire d'Hématologie

Thèse N°

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue par

Ibtissam YOULYOUZ-MARFAK

Le 04 Mars 2008

**Relation entre p53 et STAT1 : Etude de la réponse aux
stress génotoxiques et des modèles cellulaires B
immortalisés par le virus d'Epstein Barr**

JURY :

Président

M. Michel Cogné – Professeur (CNRS), Limoges

Rapporteurs

M. Eric Solary – Professeur, Dijon

M. Didier Trouche – Directeur de Recherche (CNRS), Toulouse

Examineurs

Mme. Evelyne May – Professeur (CNRS), Paris

M. Remi Fagard – Professeur, Paris

Directeur de Thèse

M. Jean Feuillard – Professeur (CNRS), Limoges

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur Le professeur Michel Cogné d'avoir accepté la présidence de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean Feuillard pour la confiance qu'il m'a témoigné et pour le temps qu'il a consacré pour diriger cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Eric Solary et Monsieur le Docteur Didier Trouche d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie Madame le Professeur Evelyne May et Monsieur le Professeur Remi Fagard d'avoir accepté de faire parti de ce jury de thèse ainsi que pour leur collaboration et leurs conseils scientifiques avisés.

Un grand merci à tous mes collègues (les deux étages confondus) pour leur gentillesse et leurs conseils. Si j'ai appris quelque chose dans la labo c'est que l'union fait la force surtout pour le calcul. N'est ce pas SP ??

Je remercie également le personnel du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges pour leur gentillesse.

Un très grand merci aux deux hommes de ma vie, mon mari et mon fils pour leur amour et leur compréhension (surtout ces derniers jours). Abdel, merci pour ton soutien ta générosité et ton aide précieuse. Bravo pour m'avoir supporté durant mes années universitaires mais surtout doctorales.

Liste des publication

EBV latency III immortalisation program sensitives B cells to introduction of CD95-mediated apoptosis via LMP1 : role of NF-kappaB, STAT1 and p53.

Le Clorennec C, youlyouz-Marfak I, Adriaenssens E, Coll J, Bornkamm GW, Feuillard J.
Blood. 2006 Mar 1; 107(5): 2070-8 Blood. 2006 Mar 1; 107(5): 2070.

PK11195 potently sensitives to apoptosis induction independently from the peripheral benzodiazepin receptor.

Gonzalez-Polo RA, carvalho G, Braun T, Decaudin D, Fabre C, Larochette N, Perfettini JL, Djavaheri-Mergny M, Youlyouz-Marfak I, Codogno P, Raphael M, Feuillard J, Kroemer G.
Oncogene. 2005 Nov 17; 24(51): 7503-13.

Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-KappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalised B cells.

Najjar I, Baran-Marszak F, Le Clorennec C, Laguillier C, Schischmanoff O, Youlyouz-marfak I, Schlee M, Bornkamm GW, Raphael M, Feuillard J, Fagard R.
J Virol. 2005 Apr; 79(8): 4936-43.

Expression of splice variant of the platelet-activating factor receptor transcript 2 in various human cancer cell lines.

Youlyouz I, Magnoux E, Gugliemi L, Denizot Y.
Mediators Inflamm. 2002 Oct ; 11(5) : 329-31.

Effect of tumor necrosis factor alpha and infliximab on apoptosis of B lymphocytes infected or not with Epstein-Barr virus.

Baran-Marszak F, Laguillier C, Youlyouz I, Feuillard J, Mariette X, Fagard R, Raphael M.
Cytokine. 2006 Mar 21;33(6):337-45.

Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents.

Youlyouz-Marfak I, Gachard N, Le Clorennec C, Najjar I, Baran-Marszak F, Remieras L, Jaccard A, Bornkamm GW, Fagard R, Feuillard J.
Cell Death & differentiation 2008 Feb; 15 : 376-385

Molecular Basis of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Cytotoxicity in EBV Latency III B-cells: LMP1 induces type II Ligand independent Autoactivation of CD95/FAS with Caspase-8 mediated Apoptosis.

Le Clorennec Christophe, Ouk Tan-Sothéa, Youlyouz-Marfak Ibtissam, Panteix Stéphanie, Julia Rastelli, Adriaenssens Eric, Ursula Zimmer-Strobl, Coll Jean, Feuillard Jean and Jayat-Vignoles Chantal.

(En révision)

ABBREVIATIONS

aa : acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

AP-1 : Activator Protein-1

APAF-1 : Apoptosis Protein Associated Factor

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASK : Apoptosis Signal-regulating Kinase

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine triphosphate

BAD : Bcl-XL/bcl-2 associated death promoter homolog

BAK : Bcl-2 homologous antagonist/killer

BAX : Bcl-2 associated X protein

BCL2 : B-cell lymphoma 2

BCL-X_L : longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian

BCR : B cell receptor

BH : Bcl-homology

BID : BH3 interacting death domain agonist

BIK : Bcl-2 Interacting Killer

Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death

BIR : Baculovirus IAP Repeat

BIV : Bovine Immunodeficiency Virus

Bmf : a BH3 only protein

CAD : Caspase Activated Dnase (ou DFF40)

CAK : CDK-activating kinase

CARD : Caspase Recruitment Domain

Caspase : cystéine aspartate protéase ou cysteinyl aspartate-specific proteinase

CD : Cluster of Differentiation

Cdc : cell division cycle

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CIP : CDK-interacting protein

CKI : cyclin-dependent kinase inhibitor

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CNP : carcinome indifférencié du nasopharynx

CREB : cAMP response element binding protein

Crm A : Cytokine Response Modifier A

CRM1 : Chromosomal Region Maintenance 1

CTAR : C terminal activating regions

CTL : lymphocytes T CD8 CD4

Da : dalton

DD : death domain
DED : Death Effector Domain
DEF: death effector filaments
DFF 40 : DNA Fragmentation Factor 40 (ou CAD)
DIABLO : Direct Binding Protein with Low pI
DISC : Death-Inducing Signalling Complex
DNA-PK : DNA Dependent Protein Kinase
DR : Death Receptor
DR3 L : Death Receptor 3 Ligand
E2F : adenovirus early region 2 factor
EBER : EBV encoded RNA
EBNA : Epstein Barr virus-encoded Nuclear Antigen
EBNA-LB : EBNA- leading protein
EBV : Epstein Barr Virus
EGF : Epithelial Growth Factor
Egl : Egg- laying defective
ERK : Extracellular signal Regulated protein Kinase

FADD : Fas Associated Death Domain protein
FAIM : Fas apoptosis inhibitory molecule
FAP : Fas Associated Phosphatase
Fas L : Fas Ligand (ou CD95L)
Fas : Fibroblast associated (récepteur)
FAT : FRAP/ATM/TRRAP
FATC : FAT C-terminal
FGF : Fibroblast Growth Factor
FIST : Fas interacting serine/threonine protein kinase
FLASH : Flice Associated Huge Protein
FLICE : FADD-like-IL-1 β -converting enzyme
FLIP : (Fluorescence Loss In Photobleaching) et **FLAP** (Fluorescence Recovery After Photobleaching)
FLIP : FLICE-inhibitory proteins

GADD-45 : growth arrest and DNA damage (type 45)

IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase
IR : Internal Repeat
IRF : Interferon Regulatory Factor
ISRE : Interferon-Stimulated Response Element
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine based Activator Motif

JAK : JAnus Kinase
JNK : Jun Kinase
kDa : Kilo dalton

KIP : CDK Inhibiting Protein
KO : Knock Out

LCL : Lignée Cellulaire Lymphoblastoïde
LMP1 : Latent Membrane Protein-1
LPS : Lipopolysaccharides

MAPK : Mitogen Activated protein Kinase
Mcl-1 : ML-1 human myeloid leukemia cell line
MNI : Mononucléose Infectieuse
MTBP : MDM2 Transformed p53 Binding Protein

NEMO : NF- κ B Essential Modulator
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
NGFR : Nerve Growth Factor Receptor
NIK : NF- κ B Inducing Kinase
NK : Natural Killer
NLS : Nuclear Localization Signal
NO : Nitric Oxide
NOXA : BH3-only member of the Bcl-2 family

OD : Oligomerization Domain
ORF : Open Reading Frame

p53 (TP53) : p53 protein
PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
pb : Kilo paire de base
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PDK : Phosphoinositide Dependent Kinase
PHD : Plant Homodomain
PI3K : Phosphatidylinositide 3 kinase
PIT : Point d'initiation de la Transcription
PKC, PKA : Protéine Kinase C ou A
PM : Poids Moléculaire
pRb ou Rb : protéine du Rétinoblastome
PTK : protein tyrosine kinase
PUMA : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
PxxP : motif impliqué dans l'apoptose

RFC : Replication Factor C
RHD : Rel Homology Domain
RIP : Receptor Interacting Protein
ROS : Reactive Oxygen Species
RPA : Replication Protein A

SAM : Sterile Alpha Motif
SAPc: SLAM lymphocytic activation molecule associated protein
SAPK : Stress Activated Protein Kinase
SEK : SAPK/ERK kinase
SH2: Src Homology
sIMP : Soluble Intermembrane mitochondrial protéines
Smac : Second Mitochondrial Activator of Caspases
STAT : Signal Transducers Activators of Transcription
SUMO : Small Ubiquitin-related Modifier

TAB : TAK binding protein
TAD : Transactivation Domain
TAK : transforming growth factor beta activated kinase
Tc-PTP : T cell Protein Tyrosine Phosphatase
TCR : T Cell Receptor
TD : Transcription Domain
TGF : Transcription Growth Factor
TK : Thymidine Kinase
TLR : Toll like receptors
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor
TR: Terminal Repeat
TRADD : TNFR-Associated Death Domain
TRAF : TNF-Receptor-Associated Factor
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TR-L1: TR located LMP1 promotor

U : Unique region
UL : Long Unique region
US : Short Unique region
UV : Ultra-Violet

XRCC : X-ray Repair Cross Complementing genes

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
PARTIE 1 : GENERALITES	3
A. LE CYCLE CELLULAIRE	3
I. Généralités	3
II. Les phases du cycle	3
III. Le contrôle du cycle cellulaire	4
III.1. Les Cyclines	5
III.2. Les Kinases Dépendantes des Cyclines	5
III.3. La famille des protéines du rétinoblastome	6
III.4. La famille des inhibiteurs KIP/CIP	6
III.5. La famille des inhibiteurs INK4	7
B . LE CANCER	7
I. Généralités	7
II. Causes du cancer	7
III. Quelques notions sur la biologie du cancer	8
IV. Les gènes du cancer	9
PARTIE 2 : APOPTOSE ET REPONSES CELLULAIRES AUX STRESS GENOTOXIQUES	12
A. L' APOPTOSE	12

I.	La mort cellulaire programmée ou apoptose	12
I.1.	La nécrose	12
I. 2.	L'apoptose	14
I.2.1.	Généralités	14
I.2.2.	Pathologies et dérégulations de l'apoptose	14
I.2.3.	Les effecteurs de la mort cellulaire	15
I.2.3.1	<i>Les caspases (cysteinyll aspartate-specific proteinases)</i>	15
a.	Principales caractéristiques et classification des caspases	16
b.	Activation des caspases	17
c.	Rôle des caspases	19
d.	Régulation des caspases	21
I.2.3.2.	<i>Les voies d'activation des caspases</i>	22
a.	La voie intrinsèque ou mitochondriale	22
b.	La voie extrinsèque ou la voie des récepteurs de mort	25
b.1.	Le récepteur Fas	26
b.2.	Activation de Fas	27
b.3.	Voie proliférative : paradoxe de l'activation de Fas	30
I.2.3.3.	<i>Apoptose indépendante des caspases</i>	31
B.	LES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LES AGENTS GENOTOXIQUES	
I.	Causes des lésions d'ADN	31
I.1.	Les agents chimiothérapeutiques	31
II.	Les types de lésions d'ADN	32
III.	Les conséquences des lésions d'ADN	34
III.1.	Les mécanismes de réparation des lésions d'ADN	35
III.1.1.	Réparation par excision de bases (BER, Base Excision Repair)	35
III.1.2.	Réparation par excision de nucléotides (NER, Nucleotide Excision Repair)	35
III.1.3.	La réparation par recombinaison homologue, HRR	37
III.1.4.	La suture non homologue des extrémités, NHEJ	37
IV.	Détection des dommages d'ADN	38
IV.1.	La kinase ATM	39
IV.1.1.	Le gène <i>ATM</i>	39

IV.1.2. Structure de la protéine ATM	39
IV.1.3. Rôles et substrats d'ATM	41
IV.1.4. Pathologies liées à ATM	42
IV.2. Autres détecteurs des lésions	43
C. L'EFFECTEUR P53 : L'UN DES ACTEURS DE LA REPONSE CELLULAIRE AUX DOMMAGES D'ADN	43
I. Historique	43
II. p53	44
II.1. Le gène <i>p53</i>	44
II. 2. La protéine p53	44
II.2.1. Structure de la protéine p53	44
II.2.2. Altérations de p53 et cancer	46
III. La régulation de p53	48
III.1. Régulation au niveau transcriptionnel et traductionnel	48
III.2. Régulation par des modifications post-traductionnelles	49
III.2.1. Dans les cellules normales non stressées	49
<i>III.2.1.1. L'ubiquitination par MDM2</i>	49
<i>III.2.1.2. Autres régulateurs négatifs</i>	52
III.2.2. Activation de p53 après un stress génotoxique	54
<i>III.2.2.1. La phosphorylation des résidus sérine et thréonine</i>	55
<i>III.2.2.2. L'acétylation des résidus lysine</i>	56
<i>III.2.2.3. La méthylation</i>	57
<i>III.2.2.4. La SUMOylation des résidus lysine</i>	57
<i>III.2.2.5. Autres régulateurs positifs de p53</i>	58
a. p14/ARF	58
b. PML (Promyelotic Leukemia protein)	60
c. ASPP (Apoptosis Stimulating Protein of p53)	60

IV. Homologues et Isoformes de p53	63
V. Rôles de p53	65
VI.1. La Sénescence	66
VI.2. La réparation de l'ADN	67
VI.3. L'arrêt du cycle cellulaire	67
VI.3.1. Le point de contrôle G1/S	67
VI.3.2. Le point de contrôle G2/M	68
VI.3.3. Le point de contrôle intra-phase S	70
VI.4. L'apoptose induite par p53	70
VI.4.1. Quels sont les mécanismes par lesquels p53 induit l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire ?	72
VI. La tyrosine kinase c-Abl	75
VII.1. La structure de c-Abl	75
VII.2. Mécanismes de la régulation de l'activité de c-Abl	76
VII.3. L'activation de c-Abl	79
VII.4. Rôles de c-Abl	81
VII.4.1. C-Abl et p53	81
VII.4.2. C-Abl et p73	83
PARTIE 3 : LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION STAT1	
I. La voie JAK/STAT	85
I.1. Les JAK	85
I.2. Les STAT	86
II. Le facteur de transcription STAT1	87
II. 1. Structure de La protéine STAT1	88
II. 2. Voies d'activation de STAT1	89
II.2.1. Activation de STAT1 par les interférons	90
II.2.2. Activation de STAT1 par v-Abl et BCR-Abl	91
II.3. Régulation de STAT1	92

II.3.1. Les modifications post-traductionnelles	92
II.3.1.1. Phosphorylation/déphosphorylation	92
II.3.1.2. Ubiquitination, ISGylation	93
II.3.1.3. SUMOylation et Méthylation	94
II.3.2. Le transport nucléo-cytoplasmique de STAT1	95
III. Mécanismes de régulation de la mort cellulaire par STAT1	97
III.1. Mécanisme dépendant de l'activité transcriptionnelle de STAT1	97
III.2. Mécanisme indépendant de l'activité transcriptionnelle de STAT1	99
IV. STAT1 et oncogenèse	101
V. IRF1 : gène cible de STAT1	101
V.1. Généralités	101
V.2. Activation et Rôles d'IRF1	103
V.3. Pathologies liées à IRF1	105

PARTIE 4 : NF- κ B ET APOPTOSE : LE MODELE EBV

A. LE VIRUS D'EPSTEIN BARR	106
I. Historique	106
II. Le virus d'Epstein Barr	106
II.1. Données épidémiologiques	106
II.2. Structure	107
II.3. Le génome viral	109
II.4. Mécanisme d'infection in vitro des lymphocytes B par EBV	110
II.5. Phase de latence	113
III. La protéine LMP-1 et la transformation cellulaire	114
III.1. La protéine LMP1	114
III.2. Rôle de LMP1 dans la transformation des lymphocytes B	116
B. LA VOIE DE TRANSDUCTION DU SIGNAL NF-κB	119
I. La voie NF-κB	119
I.1. Membres de la famille NF- κ B	119
I.2. Activation de NF- κ B	120
II. Rôles de NF-κB	123

II.1. NF- κ B et l'apoptose versus prolifération cellulaire	123
II.2. Le processus inflammatoire et immunitaire	124
III. Relation entre NF-κB et la protéine virale LMP1	125
IV. NF-κB et oncogenèse	126
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	128
RESULTATS :	133
ARTICLE 1 : Latent membrane protein 1 regulates stat1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalised B cells.	133
ARTICLE 2: EBV latency III immortalization program sentizes B-cells to induction of CD95 meditate apoptosis via LMP1 : role of NF-κB, STAT1 and p53	145
ARTICLE 3: Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumor genotoxic agents	157
DICUSSION GENERALE	178
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	194
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION GENERALE

L'exposition des cellules à un stress génotoxique entraîne une réponse cellulaire complexe qui comprend un arrêt de la progression du cycle cellulaire, la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN, l'induction de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Ces réponses sont la résultante de l'activation des mécanismes de surveillance des dommages de l'ADN dont la protéine clé est p53. P53 est un facteur de transcription qui se comporte comme un suppresseur de tumeur capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse à un stress cellulaire. Son gène est le plus fréquemment muté dans les cancers humains par exemple dans les lymphomes et les leucémies.

Le processus de cancérisation du lymphocyte B (lymphomagenèse) est un phénomène complexe résultant de la dérégulation d'un réseau de gènes. Une des causes de la lymphomagenèse est le virus d'Epstein Barr, capable de reprogrammer le lymphocyte B par détournement des voies impliquant les protéines STAT1 et p53, deux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération et la mort cellulaire. Les protéines p53, STAT1 sont des facteurs très importants impliquées dans plusieurs processus viraux et tumoraux et activés en réponse aux agents chimiothérapeutiques.

Le Virus d'Epstein Bar (EBV), premier virus transformant identifié chez l'homme, associé à différentes pathologies malignes comme les lymphomes des déficits immunitaires, les lymphomes hodgkiniens, les lymphomes nasaux de type T cytotoxique/NK, les carcinomes du nasopharynx et les lymphomes de Burkitt endémiques, immortalise les lymphocytes B qu'il infecte.

L'étude des relations entre ces facteurs de transcriptions constituerait un atout supplémentaire pour mieux comprendre les mécanismes prolifératifs et apoptotique des lymphocytes B lors d'un processus tumoral. Les perspectives attendues de ces travaux concernent tant les mécanismes fondamentaux de la prolifération cellulaire que la définition de nouvelles cibles thérapeutiques à visée anti-tumorale.

Le but de mon travail de thèse a donc consisté à étudier certaines cibles transcriptionnelles activées par l'EBV. Ainsi, les travaux réalisés durant ma thèse ont porté, d'une part en l'étude de la régulation de STAT1 par l'EBV et des relations entre les cibles transcriptionnelles NF- κ B, STAT1 et p53 l'étude de la régulation du récepteur pro-apoptotiques FAS (CD95) dans

les lymphocytes B infectés par l'EBV. Une autre partie de ma thèse a porté sur l'étude de la relation structurelle et fonctionnelle entre p53 et STAT1 dans un contexte génotoxique médié par les médicaments anticancéreux.

Nous avons mis en évidence une nouvelle voie d'activation de STAT1 impliquant la tyrosine kinase c-Abl et nécessitant la présence de protéine p53, lors du traitement des cellules par des médicaments chimiothérapeutiques. Dans le contexte du virus EBV, nous avons montré que la protéine virale LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV du programme de latence III, posséderait un caractère ambivalent. Elle peut, soit favoriser la transformation cellulaire et la prolifération via NF- κ B, soit induire l'apoptose dans certaines conditions physiologiques par l'intermédiaire de STAT1 et p53, en permettant l'activation de certaines voies apoptotiques impliquant le récepteur pro-apoptotique Fas s'auto-activant grâce à la toxicité de LMP1.

En conclusion, la compréhension du rôle des facteurs protéiques p53 et STAT1 de façon isolée et en combinatoire dans le contrôle de la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules lors d'un processus tumoral, viral et en réponse à un traitement chimiothérapeutique, nous permettra de comprendre et même de prévoir certaines résistances à la chimiothérapie.

PARTIE 1 : GENERALITES

A. LE CYCLE CELLULAIRE

I. Généralités

La division cellulaire mitotique ou mitose est un événement essentiel pour le développement embryonnaire et la croissance des enfants mais également tout au long de la vie de adulte. Tous les jours 20 millions de divisions cellulaires par seconde sont nécessaires pour renouveler les cellules. La mitose désigne le processus par lequel la cellule duplique son contenu en ADN pour engendrer deux cellules filles génétiquement identiques. Elle permet ainsi le maintien de l'information génétique constante en quantité et en qualité lors de la duplication des cellules, génération après génération. Elle correspond à un ensemble d'événements moléculaires et cellulaires orchestrés dans le temps et dans l'espace et qui doivent se passer dans un ordre chronologique précis. Ces événements répétés génération après génération, sont appelés cycle cellulaire

II. Les phases du cycle

Les mécanismes fondamentaux du cycle cellulaire s'opèrent de la même façon chez tous les organismes eucaryotes et sont hautement conservés au cours de l'évolution. Pour rappel, le cycle cellulaire se définit comme la période entre deux divisions mitotiques. Il peut être divisé en 4 phases (Figure 1) :

- **La phase G1**, phase de synthèse des ARN et des protéines
- **La phase S**, phase de réplication de l'ADN. C'est au cours de cette phase que le contenu en ADN de la cellule passe de $2n$ à $4n$
- **La phase G2**, phase de préparation à la mitose qui s'étend de la fin de la phase S jusqu'à la phase M
- **La phase M**, phase de division au cours de laquelle il y a ségrégation d'un jeu diploïde de chromosomes dans les deux cellules filles ainsi qu'une répartition équitable des autres composants de la cellule, et donne naissance à deux cellules filles similaires suite à l'étape de la cytotélerèse.

Il existe également un état hors cycle, la **phase G0**, durant laquelle la cellule ne se divise pas. La phase G0 peut être considérée comme étant en dehors du cycle cellulaire. Les cellules sont quiescentes et « attendent » des signaux leur permettant de reprendre leur progression en G1.

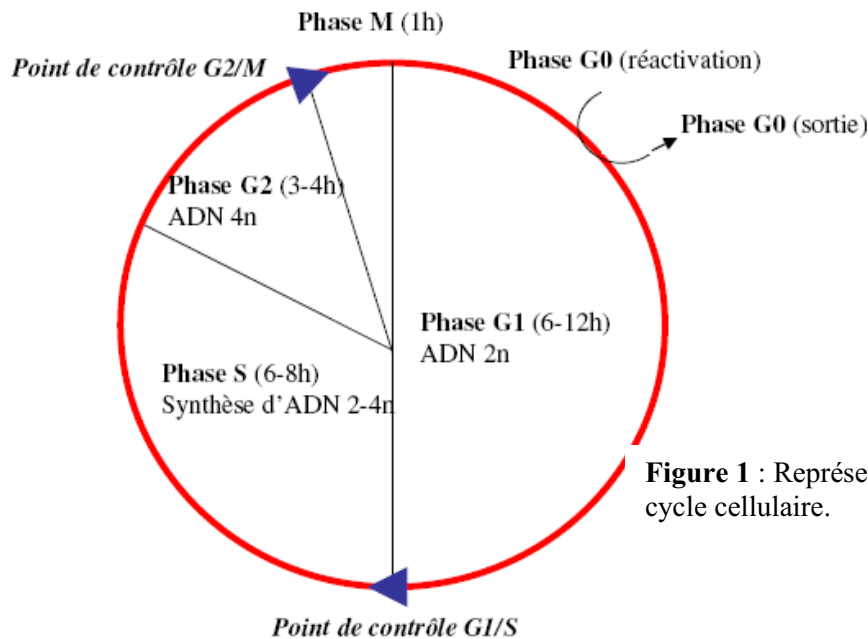


Figure 1 : Représentation schématique du cycle cellulaire.

III. Le contrôle du cycle cellulaire

L'état d'avancement dans le cycle cellulaire est contrôlé aux points de restriction ou points de contrôle, points d'engagement dans la phase suivante (G1/S et G2/M). Il existe également un point intra-phase S. Ces points de contrôle permettent la coordination entre les différentes étapes du cycle mais peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire afin de permettre à la cellule de réparer les erreurs et dommages au niveau de l'ADN avant de poursuivre son cycle de division.

La succession ordonnée des différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par une grande variété de protéines dont quatre familles majeures : les cyclines (Pines et al., 1993), les

Kinases Dépendantes des cyclines (CDK) (Pines et al., 1994), les Protéines du Rétinoblastome et les Inhibiteurs des Kinases Dépendantes des cyclines (CKI) (Denicourt et al., 2004).

III.1. Les cyclines

Les cyclines constituent une famille de protéines présentes à des taux variables selon les phases du cycle cellulaire. Elles peuvent être classées en deux sous-familles : les cyclines «START» ou G1 (cyclines C, D et E) et les cyclines mitotiques (A et B). L'expression des cyclines START C et D (D1, D2, D3) est maximale lors de la phase G1 alors que la cycline E a son pic d'expression lors de la transition G1/S. Le taux d'expression des cyclines mitotiques A et B quant à lui croît progressivement lors des phases S et G2 pour atteindre finalement un pic au cours de la transition G2/M (Pines et al., 1993). Chaque cycline a une fonction bien définie dans le temps concernant la régulation du cycle cellulaire. La liaison de la cycline permet d'une part d'orienter correctement l'ATP lié au monomère CDK lors de sa catalyse, d'autre part de rendre le site catalytique plus accessible au substrat par un changement de conformation (Jeffrey et al., 1995). Le complexe CAK (Cyclin Activated Kinase : CDK7, cycline H et Mat1) phosphoryle le dimère cycline/CDK sur une Thréonine (160 ou 161 selon les CDKs) et le stabilise. Après dissociation de la cycline, cette thréonine pourra être déphosphorylée par la CAP (CDK Associated Phosphatase).

III.2. Les Kinases Dépendantes des cyclines :

Les CDK sont des kinases largement impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire dont l'activité dépend de leur liaison avec les cyclines. (Obaya et al., JM 2002). Ces protéines kinases appartiennent à une famille de Sérine/Thréonine kinases comptant au moins huit membres numérotés de 1 à 11 (CDK1 à CDK11) (Pines et al., 1994). Chaque membre se présente sous la forme d'un hétérodimère associant une sous unité catalytique CDK et une cycline activatrice. Le monomère CDK isolé n'a pas d'activité détectable. La liaison de la cycline est une étape nécessaire mais non suffisante à l'activation de la kinase CDK. Elle modifie la conformation de la CDK et l'active (Espinoza et al., 1996, Morgan et al., 1998). En effet, il existe 3 niveaux de régulation des CDK: L'association à une cycline, des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations et des déphosphorylations, une association transitoire avec les inhibiteurs protéiques de la famille INK4 (Inhibitor of CDK4 qui comprend p16, p15, p18 et p19) (Noh et al., 1999, Sherr et al., 1999) et de la

famille Cip/Kip représenté par p21 et p27 (Polyak et al., 1994, Russo et al., 1996, Slingerland et al., 1994).

III.3. La famille des protéines du rétinoblastome

Les protéines Rb, p107 et p130 de la famille du rétinoblastome sont connues pour réguler négativement la croissance cellulaire (Sherr et al., 1994). Les complexes cyclines/CDKs peuvent interagir avec les protéines du rétinoblastome via un domaine appelé « Pocket Domain », d'où leur nom de protéines de la poche. Les complexes cyclines/CDKs actifs phosphorylent les protéines du rétinoblastome, modulant ainsi leur interaction avec un grand nombre de protéines cellulaires (Calbo et al., 2002, Garriga et al., 2004). En effet, seules les formes non phosphorylées ou hypophosphorylées de ces protéines peuvent lier leurs ligands et régulent négativement la progression du cycle cellulaire par la répression de l'expression de nombreux régulateurs du cycle cellulaire tels que les cyclines E et A, CDK1 et CDC25C (Coqueret et al., 2002, Strobeck et al., 2000). L'action inhibitrice des protéines de la poche sur la prolifération s'exerce largement par le contrôle des facteurs E2F. Inversement, la phosphorylation des protéines de la poche par les complexes cyclines/CDKs lève la répression de ces gènes en libérant les facteurs E2Fs et relance la progression dans le cycle cellulaire.

III.4. La famille des inhibiteurs KIP/CIP

Les membres de cette famille sont p21/Waf1 (noté p21), p27/Kip1 (noté p27) et p57kip2. Ils se lient et inhibent la plupart des complexes cyclines/CDK (Coqueret et al., 2003). Des études structurales ont montré que p21 et p27 agissent en modifiant la structure du site actif de la sous unité CDK (Russo et al., 1996). Leur liaison au complexe cycline /CDK mime la fixation de l'ATP et empêche sa catalyse. Le p27 est un suppresseur de tumeur qui empêche la progression cellulaire en phase S en bloquant les complexes cycline E/CDK2 et cycline A/CDK2. La protéine p21 a une spécificité plus large puisqu'elle inhibe l'activité des complexes cycline E-A/CDK2 et cycline B/CDK1. Il s'agit de l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à divers stress cellulaires (Sherr et al., 1999).

III.5. La famille des inhibiteurs INK4

Les membres de la famille INK4 sont p15INK4B, p16INK4A, p18^{INK4C}, et p19INK4D. Ils inhibent la progression dans le cycle cellulaire seulement en présence d'une protéine Rb fonctionnelle. Ils se lient spécifiquement aux kinases CDK4 et CDK6 (Jeffrey et al., 2000), qu'ils inhibent en empêchant la liaison de la cycline D. Il apparaît donc que ces inhibiteurs agissent pour empêcher les phosphorylations de la Rb en inhibant les kinases CDK4 et CDK6. La p15INK4B et la p16INK4A ont donc un rôle important en empêchant le déclenchement de la prolifération cellulaire et sont de ce fait des gènes suppresseurs de tumeurs, fréquemment altérés dans les tumeurs.

Toute dérégulation de ces mécanismes de contrôle peut induire à court ou à long terme une prolifération anarchique des cellules et conduire à l'apparition de tumeurs.

B. LE CANCER

I. Généralités

Le terme de cancer est attribué à un grand nombre de maladies malignes différentes avec une étiologie et des manifestations très variées impliquant des soins et des traitements différents. L'évolution des techniques d'étude des cancers a permis d'établir que la transformation cancéreuse était caractérisée par un ensemble complexe de changements génétiques conduisant à la multiplication de certaines cellules de l'organisme lesquelles prolifèrent de façon incontrôlée, deviennent immortelles, échappent aux mécanismes normaux de différenciation et se développent de manière anarchique. Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans le monde, surtout dans les pays industrialisés et son incidence continue d'augmenter. Ce fait est dû au vieillissement de la population mais aussi à des facteurs génétiques, ainsi qu'à des causes environnementales, encore mal comprises.

II. Causes du cancer

Approximativement 70% des cancers peuvent être attribuées au mode de vie et au régime alimentaire, l'exposition au tabac constituant à elle seule le facteur principal (30%) (Doll et al., 1981) l'exposition à des agents carcinogènes chimiques (diméthylbenzanthracène (DMBA) ou les médicaments anticancéreux ou physiques (rayons gamma, UV). Un autre facteur de risque est une consommation insuffisante de légumes et de fruits, qui ont un effet

préventif. Certains virus, tels que le virus d'Epstein Barr et le virus d'hépatite B, induisent également des cancers, via l'expression d'oncogènes capables de déréguler les mécanismes régissant la croissance et la prolifération cellulaire et amenant à la transformation de la cellule (Figure 2).

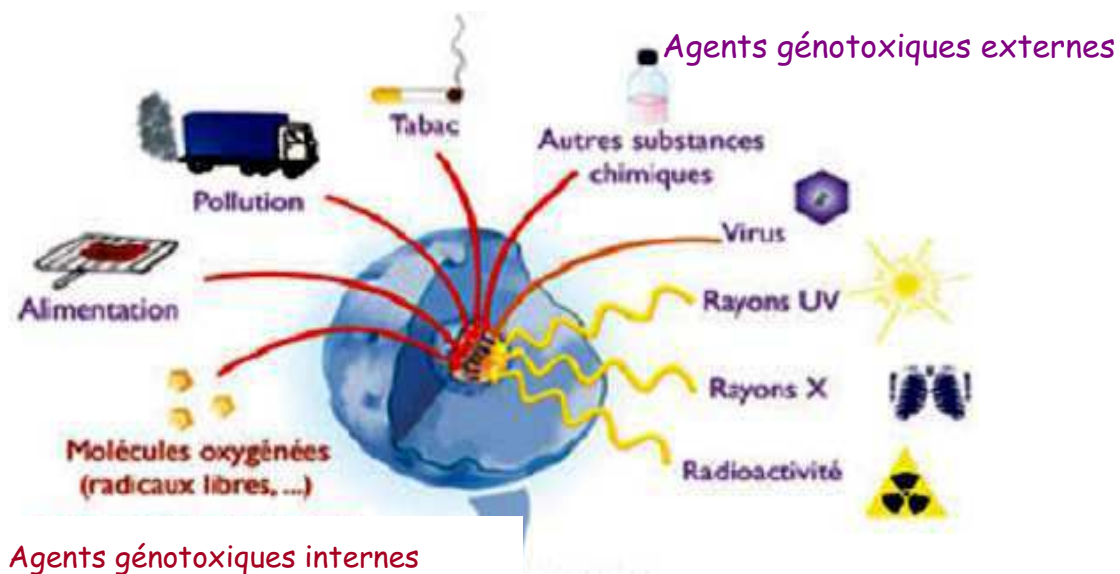


Figure 2 : Représentation de certains agents carcinogènes.

III. Quelques notions sur la biologie du cancer

Malgré la grande diversité des cancers, les cellules cancéreuses partagent des caractéristiques qui permettent de les identifier. Ces caractéristiques sont l'indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une capacité proliférative illimitée, la capacité de susciter l'angiogenèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif (Hanahan et al., 2000). Les cellules cancéreuses sont également résistantes à la mort cellulaire programmée ou apoptose. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée

essentiel au développement et à l'homéostasie tissulaire et également un excellent moyen de défense contre le cancer. La machinerie apoptotique contrôle la prolifération cellulaire et joue un rôle important dans la surveillance et le maintien de l'intégrité génétique. Elle permet l'élimination des cellules qui ont accumulé trop d'anomalies génétiques. L'absence ou des modifications d'un ou de plusieurs acteurs protéiques de cette machinerie augmentent considérablement les risques de développer un cancer (Hanahan et al., 2000, Marahatta 2005). Ces particularités propres aux cellules cancéreuses sont la conséquence de l'altération du matériel génétique d'une cellule. Les cellules tumorales accumulent de plus en plus de mutations favorisant l'instabilité génétique croissante. Toutefois, toutes les mutations ne sont pas susceptibles d'entraîner la formation d'un cancer. Les gènes considérés comme ayant une implication significative dans la mise en place du processus tumoral sont les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (Weinberg et al., 1994, Hanahan et al., 2000).

IV. Les gènes du cancer

L'inaptitude de la cellule cancéreuse à réguler son cycle cellulaire peut être due à deux mécanismes distincts (Figure 3):

- *La sur-activation d'oncogènes* : Les oncogènes sont des gènes susceptibles de conférer le phénotype tumoral à une cellule eucaryote normale. Ils sont dérivés de gènes cellulaires appelés proto-oncogènes ayant subi une ou plusieurs altérations. L'appellation « proto-oncogènes » regroupe des gènes qui codent pour des facteurs de croissance, des récepteurs aux facteurs de croissance, des molécules intervenant dans la transduction des signaux mitotiques, des protéines kinases, des phosphatases, des molécules anti-apoptotiques ou des facteurs de transcription. Ainsi, les proto-oncogènes possèdent des fonctions dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la survie cellulaire (Weinberg et al., 1994). L'activation des proto-oncogènes en oncogènes se fait par des événements génétiques tels que des mutations, des translocations chromosomiques ou des amplifications géniques qui induisent des gains de fonction du gène par rapport à sa forme. L'activation de ces oncogènes est un mécanisme dominant qui conduit à favoriser un état permissif pour la prolifération, et à permettre la production par la cellule cancéreuse des facteurs de croissance dont elle a besoin ou à modifier un récepteur de telle sorte qu'il se comporte comme s'il était stimulé en permanence. Dans les deux cas, la cellule devient indépendante d'une intervention externe.

- *Les gènes suppresseurs de tumeurs* : Ce sont des anti-oncogènes codant pour des protéines inhibitrices de la division cellulaire, ou régulant la différenciation post-mitotique et

l'orientation irréversible vers la voie de l'apoptose. La mutation de ces gènes, liée cette fois à une perte de fonction, entraîne l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire. Les anti-oncogènes p53 et RB sont des gènes très fréquemment altérés dans de nombreux cas de cancers. Le gène RB code pour une protéine qui se lie à des facteurs de transcription essentiels à la progression du cycle cellulaire et les inactive. Son inactivation constitutive est responsable des formes héréditaires de rétinoblastomes (Issing et al., 1993, Iida et al., 2003). Le gène TP53 code pour une phosphoprotéine. Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides. Les mutations constitutionnelles de ce gène représentent la base moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant des sarcomes des tissus mous, des ostéosarcomes, des tumeurs du système nerveux central, des cancers du sein et des corticosurrénales (Khayat et al., 2004, Lang et al., 2004).

De part leur rôle dans plusieurs processus cellulaires (Weinberg et al., 1994), la combinaison de l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs est responsable de la prolifération cellulaire incontrôlée à l'origine des cancers.

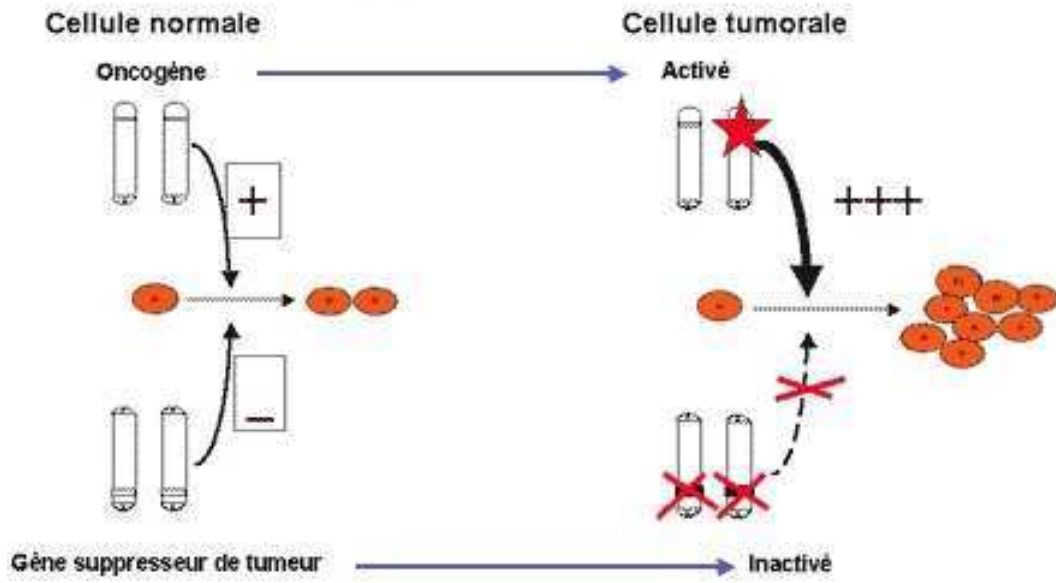


Figure 3 : Comparaison entre les gènes suppresseur de tumeur et oncogènes.

PARTIE 2 : APOPTOSE ET REponses CELLULAIRES AUX STRESS GENOTOXIQUES

A. L' APOPTOSE

I. La mort cellulaire programmée ou apoptose

Il existe plusieurs processus de mort cellulaire induits de façon programmée ou non. Lorsqu'une cellule ne peut pas réparer son contenu génétique, elle meurt dans la majorité des cas. Le type de mort cellulaire dépend de plusieurs facteurs : la gravité des lésions de l'ADN mais surtout le taux d'ATP intracellulaire et bien évidemment la fonctionnalité de la machinerie apoptotique. En effet, en cas de stress sévère, il existe deux possibilités, soit la cellule possède un niveau d'ATP suffisant et peut donc entrer en apoptose soit elle n'a pas assez d'énergie et meurt alors par nécrose (Tsujimoto et al., 1997).

L'apoptose peut être activée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, mais aussi par des stimuli pathologiques. Elle est responsable de l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydatif, par des perturbations intracellulaires comme une perméabilisation de la membrane mitochondriale, par un problème d'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire par des altérations génétiques, par la maladie, par un choc thermique ou par l'exposition à des agents génotoxiques (chimiothérapie et radiothérapie) (Green et al., 1998).

I.1. La nécrose

C'est une mort accidentelle résultant d'une catastrophe bioénergétique suite à l'épuisement de l'ATP. Elle est caractérisée par un gonflement de la cellule, une vacuolisation du cytoplasme et une perméabilisation de la membrane plasmique qui conduit à la perte du contenu cellulaire. La libération des protéines cellulaires active la réponse immunitaire et provoque une inflammation. Les cellules qui meurent par nécrose montrent fréquemment des changements de morphologie du noyau mais pas de condensation et de fragmentation de l'ADN en fragments de 200pb caractéristiques de l'apoptose, car les endonucléases agissent d'une façon aléatoire (Bicknell et al., 1995).

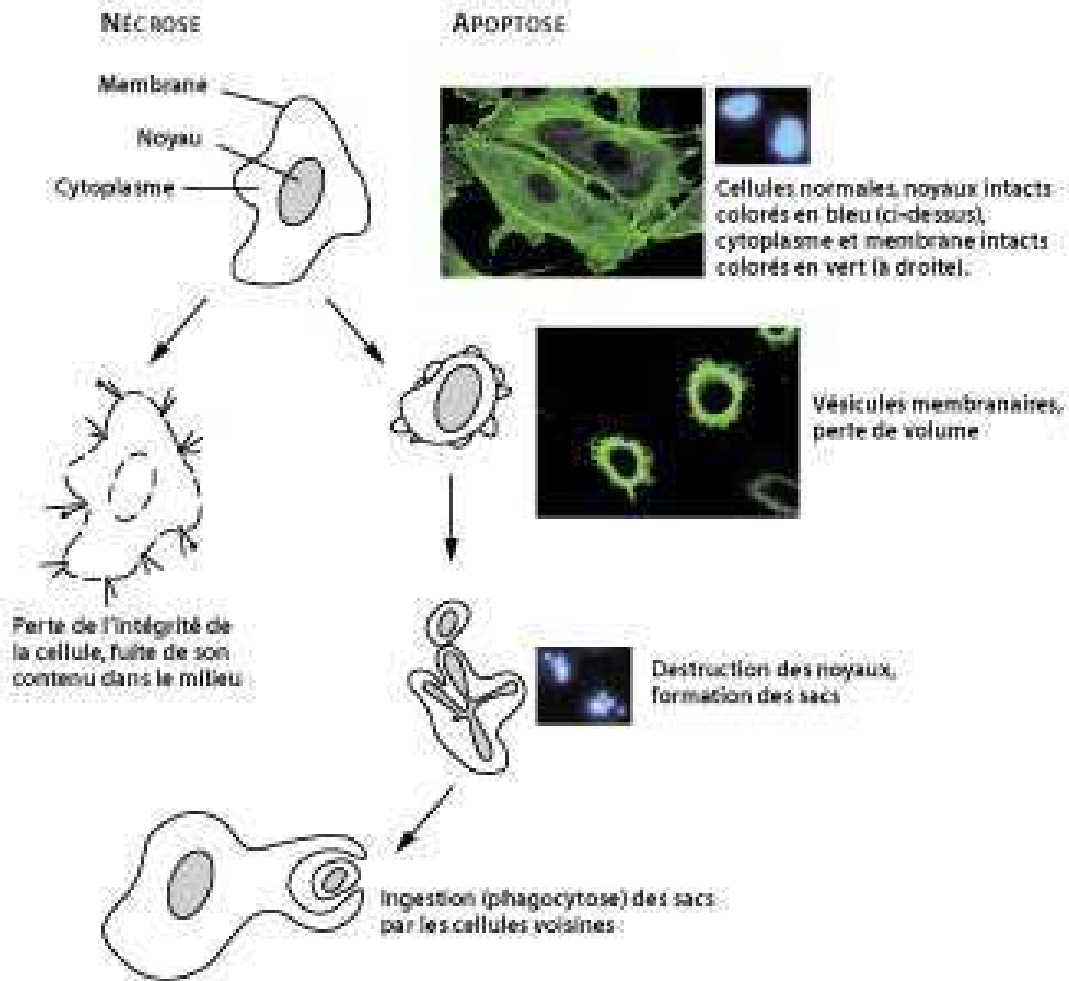


Figure 4 : Apoptose et nécrose.

I. 2. L'apoptose

I.2.1. Généralités

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire programmée et ordonnée en différentes étapes (figure 4) (Kerr et al., 1972). Elle permet l'élimination des cellules cibles sans endommager le tissu. Elle a été caractérisée par Kerr et Willie en 1972. Elle est caractérisée par de nombreux changements cellulaires au niveau morphologique et biochimique, notamment : une diminution du volume de la cellule causée par une importante condensation du cytoplasme et du noyau. La chromatine est ensuite clivée en des fragments de 200pb (nucléosome) (Wyllie et al., 1980, Wyllie et al., 1984). La mitochondrie est également modifiée, il y a relargage du cytochrome C dans le cytoplasme (Yang et al., 1997, Kluck et al., 1997) et baisse du potentiel membranaire mitochondrial à l'origine de l'ouverture des pores membranaires (Marchetti et al., 1996, Vander et al., 1997, Zamzami et al., 1996). La membrane plasmique bourgeonne ce qui conduit à la formation des corps apoptotiques qui sont éliminés par les cellules adjacentes ou les macrophages. Le processus d'élimination est facilité par un changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui basculent d'une orientation intracytosolique vers une orientation extracellulaire. L'apoptose exige un niveau d'énergie sous forme d'ATP très important. Cependant, certains événements apoptotiques tels que la fragmentation de l'ADN ne nécessitent pas d'énergie.

I.2.2. Pathologies et dérégulations de l'apoptose

L'apoptose intervient dans le maintien de l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau ou au cours du développement des lymphocytes où les cellules dysfonctionnelles ou autoréactives meurent, de même qu'à la fin de la réaction immunitaire, où les lymphocytes T activés en surnombre, meurent également par apoptose. L'apoptose joue un rôle important dans l'embryogenèse, dans l'atrophie et la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs.

Des dérèglements du processus apoptotique ou de son contrôle, aboutissant à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, sont à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies (Follezou et al., 1999). Un excès d'apoptose dans le système nerveux

central est retrouvé dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Mattson et al., 2004), la sclérose latérale amyotrophique (Sathasivam et al., 2001) ou la maladie de Parkinson (Tatton et al., 2003). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale découlant de l'apoptose des neurones conduit à une atrophie cérébrale.

De même, le virus de l'immunodéficience humaine active l'apoptose des cellules T-auxiliaires (TH) nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la défense contre les virus (Roshal et al., 2001).

Un déficit de l'apoptose peut aussi causer diverses affections telles que les maladies autoimmunes (arthrite rhumatoïde) qui se traduisent par une apoptose insuffisante des cellules autoimmunes réactives.

Une absence d'apoptose peut également favoriser la survie et la croissance de cellules anormales, normalement destinées à mourir, et ainsi induire des processus de cancérogenèse (Thompson et al., 1995, Reed et al., 1999). Certaines cellules cancéreuses ont d'ailleurs développé des mécanismes de résistance aux processus physiologiques de l'apoptose (Igney et al., 2002).

I.2.3. Les effecteurs de la mort cellulaire

L'apoptose peut classiquement être divisée en trois phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation. La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extracellulaire) est transmis à une famille de protéases appelées caspases initiatrices par des molécules adaptatrices. Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque).

1.2.3.1 Les caspases (cysteinyll aspartate-specific proteinases)

Les caspases sont des enzymes protéolytiques impliquées dans les modifications phénotypiques caractéristiques de l'apoptose. Elles sont au nombre de 14 chez l'homme (Koenig et al., 2001). Il existerait chez l'homme une " pseudo-caspase-12 " (Lamkanfi et al., 2004). Toutes ces caspases présentent des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leur spécificité de substrat. Elles sont présentes constitutivement dans la cellule et sont hautement conservées à travers les espèces (Boyce et al., 2004). Une autre protéase connue pour avoir la même spécificité est le Granzyme B, une sérine protéase contenue dans les granules des cellules cytotoxiques qui initie la mort par apoptose des cellules cibles.

a. Principales caractéristiques et classification des caspases

Les caspases sont exprimées sous forme de précurseurs inactifs ou procaspases, constitués de trois parties : un prodomaine aminoterminal de taille variable, un domaine central correspondant à la grande sous-unité (17 à 21kDa) et un domaine carboxy-terminal qui correspond à la petite sous-unité (10 à 14kDa). Les propriétés fonctionnelles des caspases basées sur ces trois caractéristiques (spécificité de reconnaissance du substrat, structure et fonction biologique) ont donc permis de les subdiviser en trois grands groupes. Le premier groupe (Groupe I) comprend les caspases 1, 4, et 5 contrôlant les réponses inflammatoires et ne jouant pas de rôle important dans l'apoptose. Leur substrat est caractérisé par la séquence WEHD. La caspase 14 présente chez l'homme est aussi une caspase « non apoptotique », car elle intervient dans la différenciation terminale de l'épiderme (Mikolajczyk et al., 2004). Les deux autres groupes sont constitués des caspases impliquées dans l'apoptose, avec d'une part les caspases initiatrices (Groupe II) et d'autre part les caspases effectrices (Groupe III). Ces deux groupes diffèrent de part la taille de leur prodomaine : Les caspases effectrices ou à petit domaine (caspase 3, 6 et 7) ou caspases initiatrices (caspase 2, 8, 9, 10) qui possèdent généralement un long prodomaine contenant un des deux motifs caractéristiques : DED (caspases 8 et 10) ou CARD (caspases 9 et 2). Ces domaines permettent l'interaction avec d'autres protéines induisant ainsi l'activation de ces caspases (Figure 5).

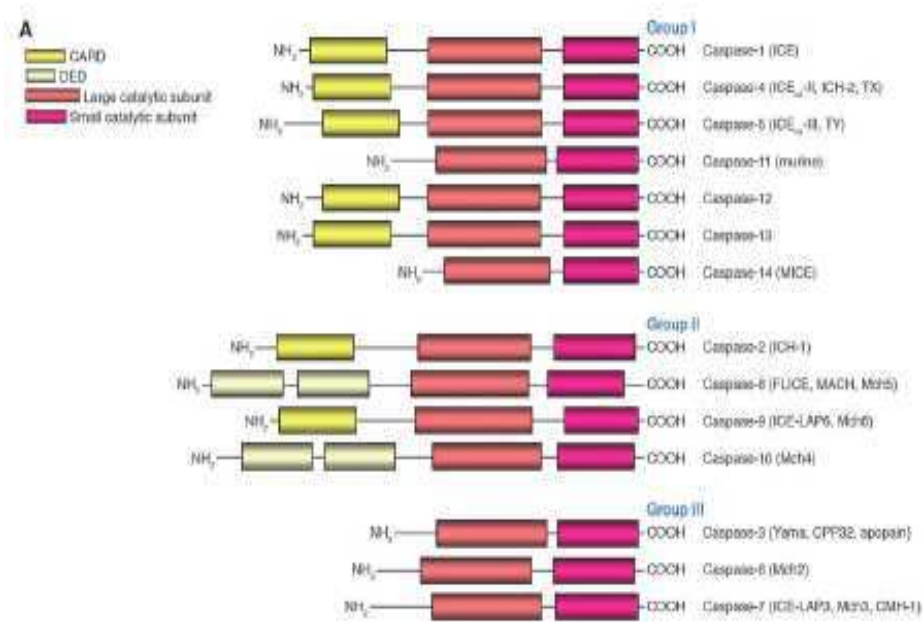


Figure 5 : La famille des caspases. Trois groupes de caspases sont présentés. Groupe I : Caspases inflammatoires. Groupe II : Caspases initiatrices de l'apoptose. Groupe III : Caspases effectrices de l'apoptose. Le domaine CARD, DED et les grandes (p20) et les petites (p10) sous-unités catalytiques sont représentées. (D'après (Lavrik et al., 2005)).

b. Activation des caspases

L'activation des caspases est un évènement précoce au cours de l'apoptose, et l'inhibition de ces caspases par des protéines virales ou par des peptides spécifiques empêche l'apparition des caractéristiques morphologiques de l'apoptose alors que l'administration de caspases recombinantes dans des cellules induit leur mort par apoptose (Thornberry et al., 1998). L'activation des caspases implique le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus, permettant l'élimination du prodomaine suivie de l'assemblage des sous-unités en hétérodimères (Figure 6). Une fois activées, les caspases initiatrices vont à leur tour activer les caspases effectrices 3, 6 et 7. Ces dernières vont cliver à leur tour un certain nombre de protéines dans la cellule. Ainsi les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices. Les caspases reconnaissent un motif térapeptidique QACXG (X pouvant être R, Q ou G), situé en amont du site de clivage au niveau de la grande sous-unité. Cette séquence

de reconnaissance diffère selon les caspases et peut expliquer la diversité de leur fonction biologique (Thornberry et al., 1998).

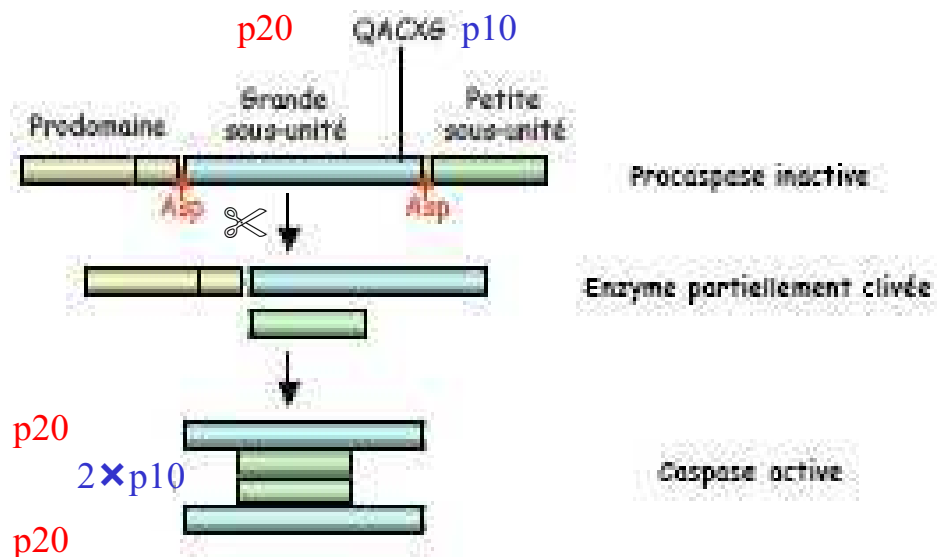


Figure 6 : Activation en cascade des caspases. Le clivage de la procaspase sur des sites de clivage spécifiques Asparagine-X (DX) conduit à la formation d'une caspase mature active, qui contient l'hétérotétramère p20-p10, et à la libération du prodomaine. Les résidus sollicités dans les centres actifs sont indiqués (D'après (Lavrik et al., 2005)).

Des études de cristallographie ont révélé que les caspases actives sont sous forme de tétramères formés par l'association de deux hétérodimères, contenant deux sites catalytiques indépendants. En outre, le propre site de clivage des caspases, séparant le pro-domaine de la grande sous-unité, contient également ce site spécifique de reconnaissance ainsi qu'un aspartate, ce qui leur permet de s'activer mutuellement (Figure 7). En effet, Les caspases peuvent s'autocliner et activer d'autres caspases ou substrats formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques (Thornberry et al., 1998).

La cellule utilise plusieurs mécanismes distincts pour activer les caspases (Boatright et al., 2003, Thornberry et al., 1998). Le plus simple appelé transactivation, consiste en l'activation des caspases par d'autres caspases (Van de Craen et al., 1999). Les autres mécanismes d'activation concernent uniquement les caspases initiatrices. Ils sont provoqués par des interactions avec des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique. Cette activation peut être due à l'induction d'un rapprochement entre plusieurs procaspases favorisant ainsi leur autoactivation (Muzio et al., 1998). Ceci a été observé pour la caspase 8,

10 et 2 lors de l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Algeciras-Schimmich et al., 2002) vont s'autoactiver. L'activation des caspases initiatrices peut aussi résulter d'une association avec une sous-unité régulatrice. C'est le cas de la caspase-9. Le clivage protéolytique de cette caspase n'est pas suffisant pour son activation. En effet, cette dernière nécessite l'interaction avec le cofacteur Apaf-1 (Rodriguez et al., 1999) (Figure 8).

Group I	Caspase-1	WEHD
	Caspase-4	(W/L)EHD
	Caspase-5	(W/L)EHD
	Caspase-13	WEHD
	Caspase-14	WEHD
Group II	Caspase-2	DEHD
	Caspase-8	LETD
	Caspase-9	LEHD
	Caspase-10	LEXD
Group III	Caspase-3	DEVD
	Caspase-6	VEHD
	Caspase-7	DEVD

Figure 7 : Spécificité du térapeptide du site de reconnaissance du substrat de chaque caspase (D'après (Wei et al., 2000)).

c. Rôle des caspases

Dans la plupart des cas, le clivage de la protéine cible conduit à son inactivation, avec une perte de son activité biologique. C'est le cas de protéines anti-apoptotiques comme les inhibiteurs de caspases : FLIP et IAP (Liston et al., 2003) ou les protéines BCL-2 ou BCL-X_L, dont le clivage résulte en la conversion de ces protéines en facteurs pro-apoptotiques (Cheng et al., 1997). Les caspases inactivent aussi des protéines de réparation comme la PARP ou Rad51 (Soldani et al., 2002), des protéines de régulation du cycle cellulaire (Jin et al., 2000) et des protéines de transduction de signaux comme AKT qui une fois clivée, n'exerce plus sa fonction de facteur de survie (Widmann et al., 1998), NF- κ B, I κ B, Phospholipase A2, STAT1. Les autres protéines cibles regroupent des protéines cytoplasmiques (Gas-2, bêta – caténine), des protéines nucléaires (MDM2, SRF, Lamine A et B1), des kinases (MEKK-1, MST 2 kinase, Wee1 kinase), des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (p21, p27 et Rb). Ces protéases induisent également une désorganisation du cytosquelette, notamment par clivage des protéines constituant les filaments intermédiaires comme la

kératine 18 (Schutte et al., 2004) ou par activation de la gelsoline. En effet, après clivage par la caspase-3, la gelsoline conduit à la dépolymérisation de l'actine (Kothakota et al., 1997). Des protéines des jonctions adhérentes, assurant les interactions entre les cellules sont aussi dégradées par les caspases (β -caténine)(Brancolini et al., 1998).

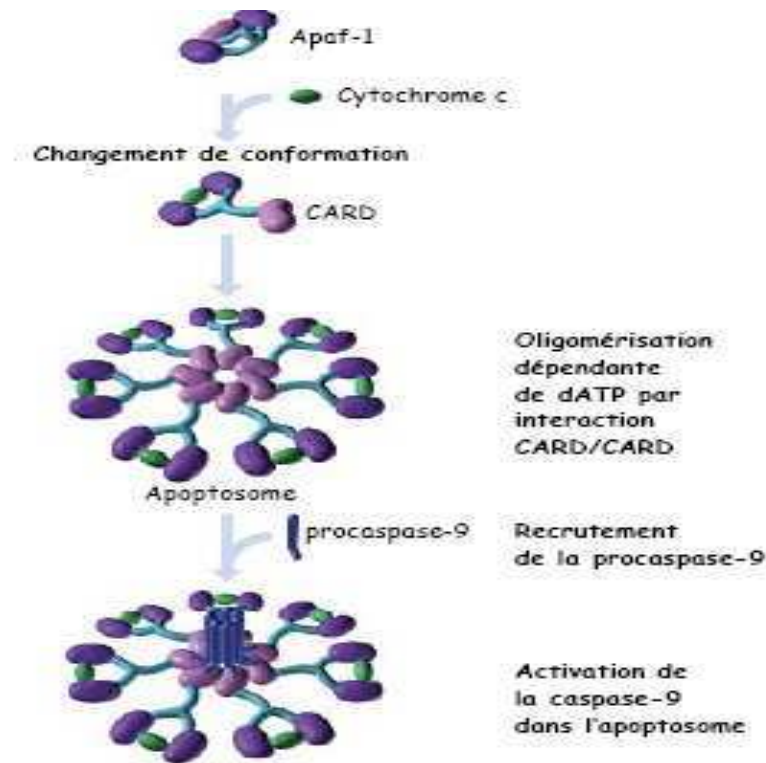


Figure 8 : Activation de la caspase 9 par la formation de l'apoptosome.

d. Régulation des caspases

Les caspases sont régulées par des inhibiteurs spécifiques, initialement découverts chez les virus. En effet, certains virus ont donc développé des systèmes de résistance à l'apoptose qui agissent sur les caspases et inhibent l'apoptose comme CrmA ou p35. La protéine CrmA (cytokine response modifier gene) du virus de la vaccine interagit avec les caspases 1 et 8 et prévient leur clivage (Zhou et al., 1997). En revanche, p35, exprimée par le baculovirus, inhibe les caspases déjà actives (Bump et al., 1995, Riedl et al., 2001). Les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) ont été découvertes initialement chez le baculovirus. Tous les membres de cette famille (XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin, Ts-IAP, NAIP) portent

une ou plusieurs copies du motif BIR (Baculovirus IAP Repeats) nécessaires pour lier et inactiver les caspases (Liston et al., 2003). Elles agissent comme des pseudosubstrats des caspases 3, 7 et 9. Elles inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices. De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine ce qui induit leur dégradation ainsi que celle des caspases auxquelles elles sont liées (Yang et al., 2000, Suzuki et al., 2001).

L'activité des caspases peut être régulée également par leur localisation cellulaire. Notamment les caspases 2, 3 et 9 qui se trouvent à la fois dans le cytoplasme et dans la mitochondrie (Susin et al., 1999). L'étude de Martins et ses collaborateurs en 1998 indique que les caspases peuvent être phosphorylées *in vivo*. Bien que cette phosphorylation puisse affecter leur activité enzymatique, au moins *in vitro*, il reste cependant à démontrer que la phosphorylation module effectivement l'activité des caspases *in vivo*. La même étude a montré que la déphosphorylation des caspases était corrélée à une augmentation de leur capacité à cliver PARP, impliquant la possibilité que la phosphorylation puisse inhiber le clivage de certains substrats par ces protéases. Une autre étude indique que la kinase AKT peut phosphoryler la procaspase 9 humaine et ainsi inhiber son activation (Cardone et al., 1998). Cependant, le rôle physiologique de cette modification post-traductionnelle reste à élucider.

1.2.3.2. Les voies d'activation des caspases

a. La voie intrinsèque ou mitochondriale

La mitochondrie joue un rôle vital dans la cellule en produisant une grande partie de l'énergie dont la cellule a besoin, en participant à l'homéostasie calcique, en maintenant le potentiel redox et le pH intracellulaire. Et aussi elle contribue au déclenchement de la mort cellulaire. Cette voie fait intervenir les protéines de la famille BCL-2, la molécule adaptatrice Apaf1 et évidemment les caspases.

Les Protéines de la famille BCL-2 : Cette famille englobe des protéines pro-apoptotiques (la sous-famille BAX et BH3) et anti-apoptotiques (la sous-famille BCL-2) (Cory et al., 2003). Chez les mammifères, elle compte environ vingt membres, qui possèdent tous au moins un des quatre motifs conservés : BH1 à BH4 (BCL-2 homology domain) (Figure 9). C'est le rapport entre le niveau des protéines pro et anti-apoptotiques qui semble déterminer la sensibilité de la cellule à l'apoptose. La plupart de ces petites protéines peuvent donc se

dimériser, ce qui se produit souvent entre protéines pro-apoptotiques et protéines anti-apoptotiques. La régulation de l'apoptose par ces protéines résulte par conséquent du niveau d'expression entre protéines pro- ou anti-apoptotiques, les cellules exprimant plus de protéines pro-apoptotiques seront sensibles à la mort, les autres seront résistantes (Hengartner et al., 2000).

Les différentes voies de signalisation mises en jeu suite à un stress cellulaire, convergent vers la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale. Ce phénomène est à l'origine de la chute du potentiel membranaire et de la libération des protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Le contrôle de la perméabilité mitochondriale est assuré par les protéines de la famille BCL-2. Parmi ces protéines, on distingue les procaspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur des caspases, la protéine Smac/DIABLO. Le cytochrome C, une fois libéré, interagit avec la protéine Apaf1 et la procaspase 9, formant ainsi un complexe protéique nommé Apoptosome (Figure 8). Ceci est à l'origine de l'activation de la caspase 9 qui va activer à son tour d'autres caspases exécutrices comme la caspase 3 (Zou et al., 1999). En ce qui concerne la protéine Smac/DIABLO, elle se lie aux inhibiteurs de l'apoptose comme les IAPs et les inactive. L'oligomérisation d'Apaf-1 est un évènement rapide et l'apoptosome formé semble stable. Il a été décrit que la caspase-9 clivée était présente aussi bien dans l'apoptosome que dans le cytoplasme, mais la caspase-9 réellement active est celle liée à l'apoptosome (Rodriguez et al., 1999).

La fonction principale des protéines de la famille BCL-2 est de contrôler la libération de facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. En effet, l'addition de protéines pro-apoptotiques est suffisante pour induire le relargage du cytochrome c, alors que l'addition de protéines anti-apoptotiques prévient ce relargage (Antonsson et al., 2000). De plus, des inhibiteurs de caspases n'altèrent pas le relargage du cytochrome c, ce qui suppose que les caspases ne sont pas impliquées dans ces évènements.

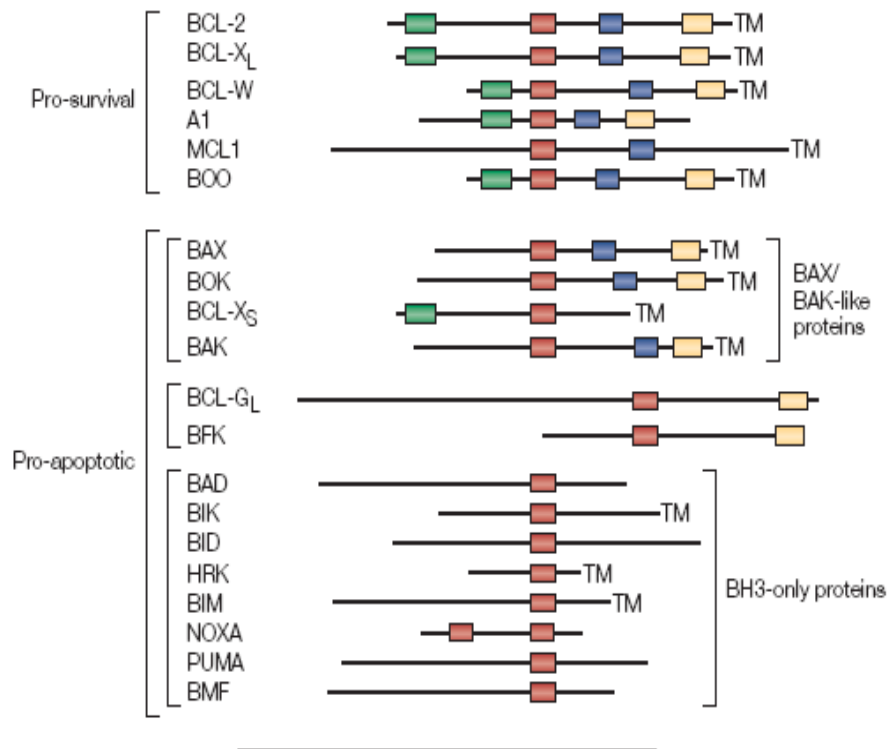


Figure 9 : Les membres de la famille BCL2 (D'après (Strasser et al., 2005)).

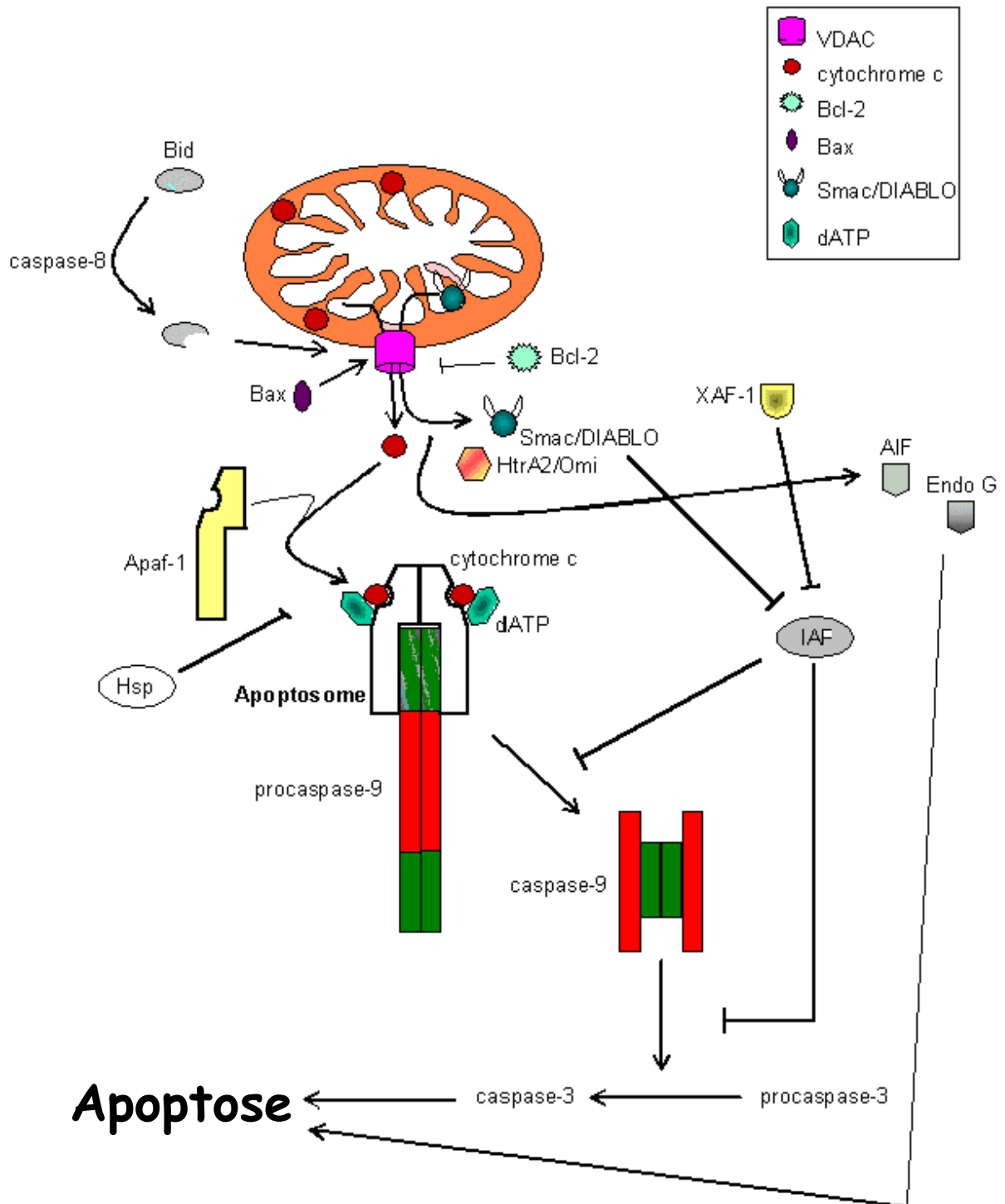


Figure10 : La voie mitochondriale d'induction de l'apoptose (Adapté d'après (Ravagnan et al., 2002)).

Plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases. C'est le cas du facteur d'induction apoptotique (AIF) et de l'endonucléase G (endo G) qui, une fois libérés de la mitochondrie, sont transloqués dans le noyau provoquant une condensation de la chromatine et une coupure de l'ADN générant de larges fragments d'ADN. La protéine AIF est impliquée dans la condensation et la fragmentation de la chromatine et la protéine Endo G coopère avec AIF pour dégrader l'ADN. (Ravagnan et al., 2002) (Figure 10).

b. La voie extrinsèque ou la voie des récepteurs de mort

Cette voie implique la présence de récepteurs membranaires de la famille du TNFR (récepteurs du facteur de nécrose tumoral TNF).

Ce sont des protéines transmembranaires de type I possédant dans leur domaine intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort (DD) dont le rôle est le recrutement d'autres protéines possédant aussi un domaine DD, qui assurent la propagation du signal de mort (Chaudhary et al., 1997, Nagata et al., 1997, Tartaglia et al., 1993). Une fois stimulés par leurs ligands, ces récepteurs induisent l'activation des caspases (Enari et al., 1995, Longthorne et al., 1997). Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (ou CD95) activé par son ligand FasL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF, la lymphotoxine α , et DR4 et DR5 qui sont les récepteurs de TRAIL (Figure 11). L'activation de ces récepteurs par leur ligand respectif conduit à l'induction d'apoptose. De plus, il existe un récepteur DR3 dont le ligand est Apo3L.

Ces récepteurs peuvent être classés dans deux groupes : les récepteurs du groupe I (Fas, TRAILR1 et TRAIL2) qui vont tous former dans leur partie cytosolique un complexe multiprotéique nommé DISC (Death Inducing Signalling Complex). Le DISC est composé de trois récepteurs préassemblés, chacun étant lié dans sa partie cytosolique à la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain), FLIP (FLICE Inhibitory Protein) et les procaspases 8 et 10. Les récepteurs du groupe II (TNFR-1, DR3, DR6 et EDAR) forment un complexe dépourvu de caspases.

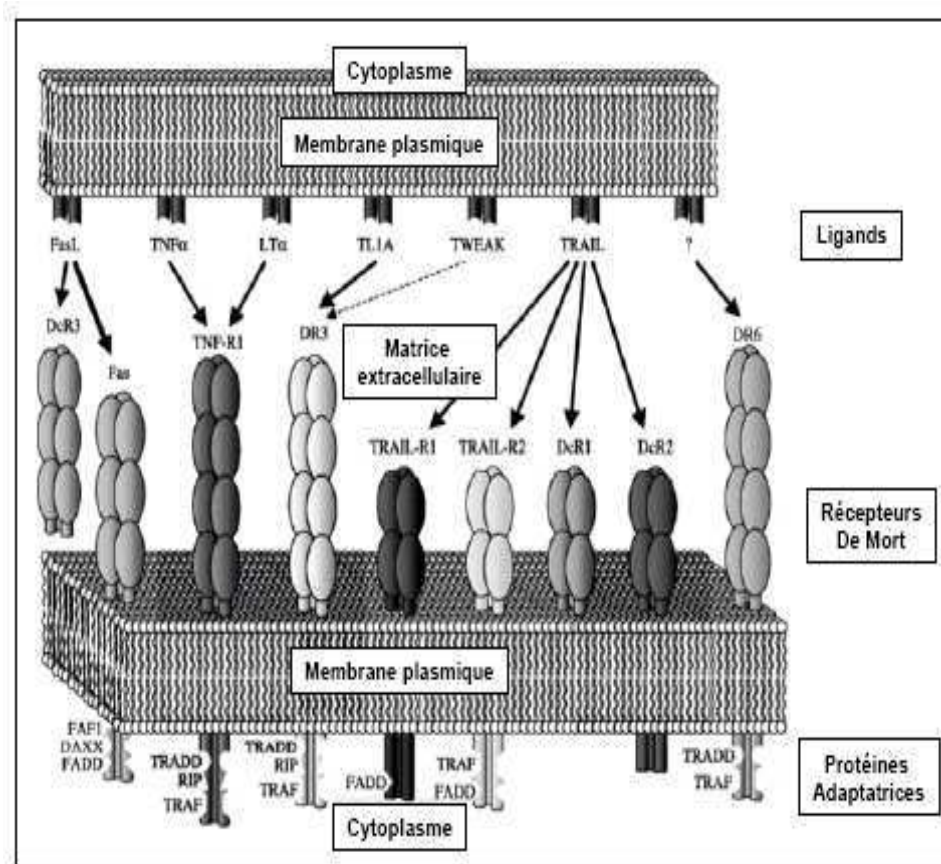


Figure 11 : Membres de la famille des Récepteurs de Mort (D'après (Curtin et al., 2003)).

Le modèle d'activation le mieux documenté est l'activation de la parocaspase 8 par le récepteur Fas :

b.1. Le récepteur Fas

Fas est une protéine de 319 aa et d'un PM compris entre 45 et 52kDa (Oehm et al., 1992) selon les études réalisées, probablement à cause de différences de glycosylation du récepteur (Kepler et al., 1999). Ce récepteur comporte un simple domaine de 17 aa (Leu 158 à Val 174), un domaine N-terminal extracellulaire riche en cystéine de 156 aa et d'un domaine C-terminal cytoplasmique contenant des acides aminés chargés (28 aa basiques et 20 aa acides). Cette partie renferme le domaine de mort cellulaire DD (85 aa) qui est dépourvu de toute activité enzymatique et propage le signal via des interactions protéine-protéine. Le domaine

DD possède la propriété de s'auto-associer et de former des agrégats de grande taille en solution (Huang et al., 1996) (Figure 12). De plus, il existe des formes solubles du récepteur, générées par épissage alternatif au niveau transmembranaire. Ces formes contribuent à la régulation de l'apoptose induite par FasL (Cheng et al., 1994, Papoff et al., 1999). Fas est exprimé à la surface cellulaire sous forme d'homotrimères pré-associés permettant par la suite la fixation des homotrimères de FasL (Papoff et al., 1999, Siegel et al., 2000).

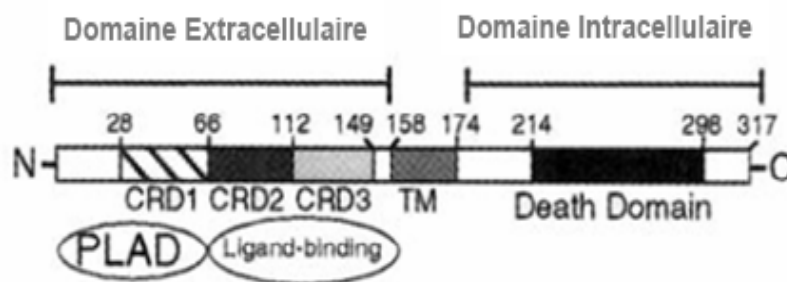


Figure 12 : Domaines protéiques du récepteur Fas.

b.2. Activation de Fas

Les travaux d'Algeciras-schimmich et ses collaborateurs ont permis de mieux définir l'ordre des événements de signalisation initiale de la voie Fas. Ainsi, la stimulation de Fas par FasL induit un changement de conformation du récepteur qui fixe au niveau de sa partie cytoplasmique, la protéine adaptatrice FADD, par interaction de leurs domaines DD (Algeciras-schimmich et al., 2002). Puis FADD recrute au niveau du récepteur plusieurs procaspases 8, par liaison de domaines homologues DED-DED, ce qui aboutit à la formation du complexe de signalisation DISC. Il a été démontré que la fixation de FasL sur son récepteur induit la formation de microagrégats de Fas. Il en résulte une activation de la caspase 8 mais avec peu d'efficacité pour pouvoir induire l'apoptose. Cependant, cette activation permet la formation de regroupements membranaires de Fas qui vont amplifier le signal apoptotique. Le complexe Fas/FasL sera alors internalisé grâce à la formation de vésicules d'endocytose par un processus encore incompris (Figure 13).

Une fois la caspase 8 activée, l'exécution de l'apoptose peut se faire de deux façons différentes selon le type cellulaire (Figure 14).

Les cellules de type I sont caractérisées par des niveaux élevés de composants du DISC et sont dotées d'une très grande activité caspase 8. L'induction de l'apoptose médiée par Fas est indépendante de la mitochondrie. Dans ce cas, les caspases 8 activées vont directement activer les caspases 3. Puis plus tardivement, les récepteurs activés vont former des agrégats qui seront par la suite internalisés (Algeciras-Schimmich et al., 2002). L'internalisation dépend également de l'actine (Algeciras-Schimmich et al., 2003).

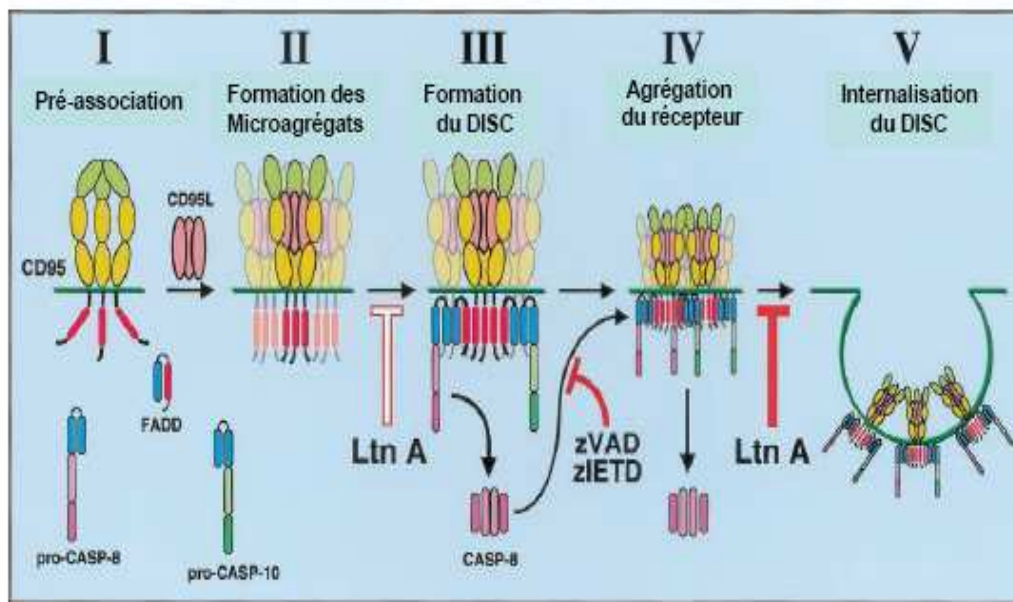


Figure 13 : Les événements membranaires proximaux de la signalisation Fas. La phase de déclenchement du signal Fas peut être subdivisée en cinq étapes distinctes. (I) pré-association de Fas indépendamment de FasL. (II) Formation des microagrégats. (III) Formation du DISC, dépendante des filaments d'actine, puisqu'elle peut être bloquée par la latrunculine A (Ltn A). Les composants du DISC sont FADD/Mort1, la procaspase-8, la procaspase-10, et c-FLIP (non montré). Regroupement ou agrégation de Fas, dépendant de la génération de la caspase 8 activée par le DISC. Cette étape peut être efficacement inhibée en pré-incubant les cellules avec le zVAD-fmk ou le zIETD-fmk. L'activation de la caspase 8 fait donc partie d'une boucle de rétroaction positive. (V) Internalisation du DISC, dépendante encore de l'actine, puisque le traitement des cellules avec la Ltn A empêche l'internalisation du récepteur agrégé. La Ltn A n'affecte pas les cellules de type II, indiquant que les étapes dépendantes de l'actine sont réduites ou absentes, expliquant pourquoi dans les cellules de type II le DISC formé est très petit. DED : Domaines bleus ; DD : Domaine rouge. Le domaine N-terminal PLAD de Fas est représenté en vert plus nuancé.

Les cellules de type II, disposent de faibles quantités de caspases 8 actives, insuffisantes pour activer la caspase 3. Elles sont dépendantes de l'activation mitochondriale de l'apoptose. Dans ce cas, l'exécution de l'apoptose nécessite une amplification mitochondriale via le clivage de BID par la caspase 8. BID activée interagit avec la membrane mitochondriale et favorise la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, ce qui conduit à la formation de l'apoptosome activant par la suite la caspase 9 qui va à son tour activer la caspase 3.

Contrairement aux cellules de type I, cette voie est inhibée par les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2. De plus, dans ces cellules de type II, il a été montré que les agrégats de Fas sont de plus petite taille et que leur formation est retardée. L'internalisation de ces agrégats semble se produire uniquement dans les cellules de type I. En revanche, il a été reporté récemment que la formation des agrégats se produit dans les deux types de cellules au niveau de domaines riches en lipides (« lipid rafts »). D'autres travaux ont même montré que l'internalisation de ces agrégats survient également dans les cellules de type II (Eramo et al., 2004).

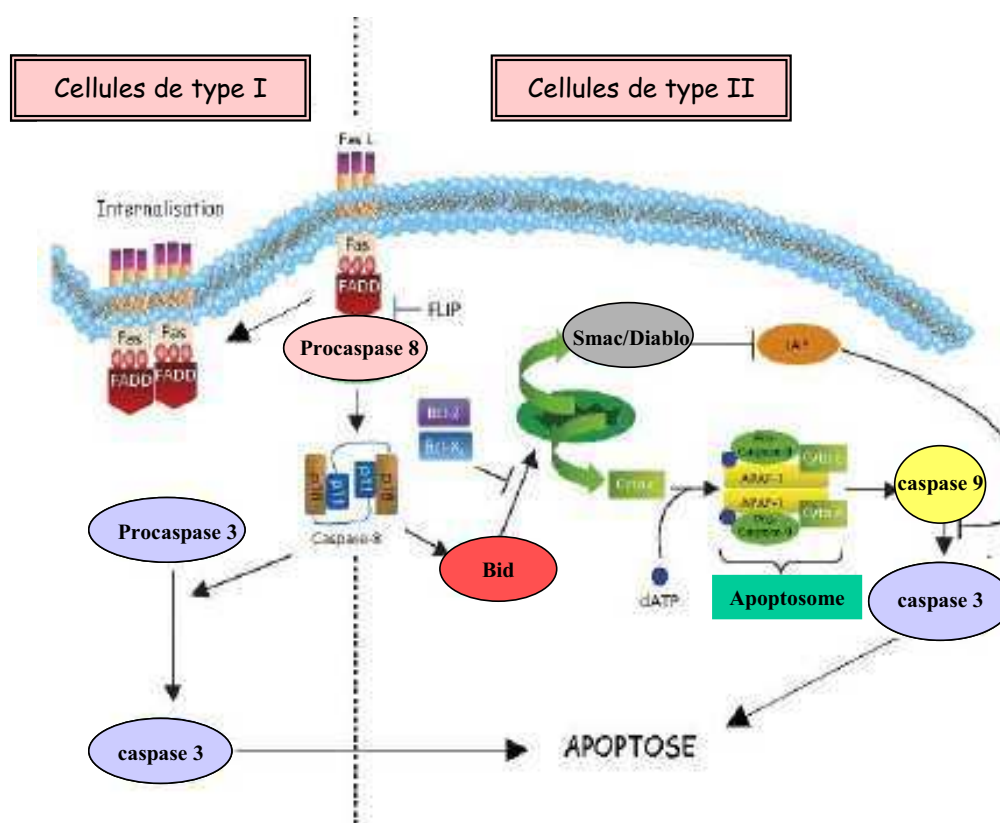


Figure 14 : Voie de signalisation de Fas dans les cellules de type I et de type II (D'après (Barnhart et al., 2003)).

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle des récepteurs de mort dans l'apoptose chimio-induite. Suite aux dommages de l'ADN induits par les agents anticancéreux, p53 peut activer

transcriptionnellement l'expression de Fas et ainsi induire la voie des récepteurs de mort. L'expression de FasL peut aussi être induite par les agents chimiothérapeutiques, mais cette activation semble être indépendante de p53 (Fulda et al., 1998). Les équipes de Gajate et de Micheau ont détecté une activation de Fas indépendante de FasL dans les mécanismes d'action de plusieurs drogues anti-tumorales comme le Cisplatine, l'Etoposide et l'Edelfosine. Les cellules déficientes en Fas sont résistantes à l'apoptose induite par l'Edelfosine. La transfection de ces cellules par une protéine Fas fonctionnelle restaure l'activation de l'apoptose par la drogue (Gajate et al., 2000). Dans les cellules tumorales traitées par des drogues anticancéreuses, l'apoptose médiée par Fas peut être bloquée par le dominant négatif de FADD, les inhibiteurs de la caspase 8, ou par deux protéines virales MC159 et E8 dont le mode d'action est de bloquer l'apoptose au niveau de FADD et de la caspase 8 (Micheau et al., 1999). De plus, dans ces cellules, il n'y a pas d'augmentation d'expression de FasL. Il a été également montré que l'activation de Fas en absence de son ligand nécessite l'agrégation de Fas dans des formations lipidiques *les rafts* (Delmas et al., 2003, Gajate et al., 2001, Gajate et al., 2005, Lacour et al., 2004, Pervaiz et al., 2004).

b.3. Voie proliférative : paradoxe de l'activation de Fas

Alderson et ses collaborateurs ont montré en 1993, un rôle prolifératif de Fas dans les lymphocytes T stimulés et des thymocytes humains purifiés (Alderson et al., 1993). D'autres études ont montré que l'activation de Fas par son ligand est suffisante pour induire la prolifération des fibroblastes de peau humains (Agarwal et al., 1995, Freiberg et al., 1997, Jelaska et al., 1998). FasL peut ainsi induire la voie ERK1/2 pro-proliférative dans les fibroblastes privés de sérum (Ahn et al., 2001). Il a été également montré que la co-stimulation de Fas et du TCR activent les caspases sans induire l'apoptose et provoque la prolifération des lymphocytes T (Alam et al., 1999, Kennedy et al., 1999, Miossec et al., 1997, Wilhelm et al., 1998). Le rôle de l'activation de Fas par son ligand dans l'activation des lymphocytes T ainsi que la stimulation du TCR induit l'expression de FasL (Nagata et al., 1995) suggèrent qu'il existe une boucle autocrine d'activation de Fas et de FasL. Celle-ci est médiée par le TCR et déclencherait une voie de signalisation non apoptotique caspase dépendante (Kennedy et al., 1999). Cependant, dans le cas où la voie Fas est bloquée, il peut y avoir une substitution de la voie Fas par d'autres récepteurs de mort tels que TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3 et DR6, dans l'induction de la prolifération.

I.2.3.3. Apoptose indépendante des caspases

Il peut arriver que la cellule meure par apoptose par des mécanismes indépendants des caspases. Xiang et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de la protéine pro-apoptotique BAX conduit à l'activation des caspases et à la mort cellulaire (Xiang et al., 1996). Cependant l'inhibiteur général des caspases zVAD-fmk est incapable d'inhiber l'apoptose induite par la surexpression de BAX. De nombreux stimuli peuvent aussi induire l'apoptose indépendamment des caspases : la privation en sérum, la surexpression de c-Myc ou de Bak (McCarthy et al., 1997), les dommages d'ADN. Ce type de mort est assez particulière car les cellules meurent sans les modifications nucléaires spécifiques de l'apoptose (Hirsch et al., 1997). Cependant, on assiste au bourgeonnement des cellules de la même façon qu'au cours de l'apoptose.

B. LES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR LES AGENTS GENOTOXIQUES

I. Causes des lésions d'ADN

La molécule d'ADN est en permanence sujette à des modifications que ce soit de manière spontanée ou à cause de facteurs environnementaux .

Il existe une multitude d'agents mutagènes qui peuvent causer des lésions au niveau de l'ADN. Ils peuvent être soit chimiques soit physiques. Les agents physiques regroupent les différents types de radiations comme les rayons X capables de provoquer principalement des cassures simples ou doubles brins et les rayons ultraviolets qui favorisent la formation des ponts entre les bases. Les agents chimiques sont très nombreux et ils peuvent être d'origine naturelle et interne tels que les radicaux libres ou externes et synthétiques tels que les médicaments chimiothérapeutiques (Figure 2). Les dommages spontanés de l'ADN existent mais ne suffisent pas pour expliquer l'incidence des cancers, du fait de l'existence de mécanismes de réparation de l'ADN (Figure 2).

I.1. Les agents chimiothérapeutiques

La chimiothérapie est devenue en 60 ans le traitement de base des hémopathies malignes (cancers du sang) et un moyen efficace du traitement des tumeurs malignes solides. Elle fait appel à des médicaments cytotoxiques dits anticancéreux. La plupart des médicaments utilisés en chimiothérapie antitumorale interagissent avec les mécanismes de la prolifération cellulaire. Cette action s'exerce directement sur l'ADN (inhibition de la synthèse ou de la transcription) ou indirectement, notamment en inhibant la synthèse de novo des bases puriques et pyrimidiques (Hartwell et al., 1997). L'action des médicaments anticancéreux induit des distorsions dans l'hélice d'ADN et ces défauts amènent au blocage de la réplication de l'ADN et/ou de la transcription. De plus, la reconnaissance de ces défauts enclenche plusieurs voies de signalisation cellulaire dont celle de l'apoptose. La cytotoxicité de certains médicaments anticancéreux tels que la doxorubicine* et le Cisplatine* peut également être indirecte par la formation des radicaux libres (Halliwell et al., 1991) qui peuvent entraîner des ruptures de brins (simples ou doubles) suite à l'oxydation des bases azotées de l'ADN.

II. Les types de lésions d'ADN

Les lésions de l'ADN ont plus d'impact sur la cellule que les lésions des protéines ou de la membrane, car ces dommages peuvent être transmis à la descendance. Il existe différents types de lésions (Figure 15):

- Altérations des bases

Les bases peuvent être détruites ou modifiées (méthylation, échange de bases). Libérées par rupture des liaisons sucre-phosphate, elles subissent surtout une hydroxylation (radical OH°) avec formation d'hydroperoxydes en présence d'oxygène. Les bases pyrimidiques sont plus sensibles que les bases puriques. On a par ordre de radiosensibilité décroissante : $\text{T} > \text{C} \gg \text{A}$. Les dommages aux bases résultent surtout de l'attaque des radicaux libres ($\text{OH}\bullet$) mais l'effet direct des agents chimiothérapeutiques peut aussi induire ces dommages (Pouget et al., 2002). Ces lésions sont en général réparées rapidement.

- Ruptures de brins d'ADN

Les ruptures de brins sont de deux types :

Les cassures simple brin (CSB)

Les cassures simple brin (CSB) de l'ADN sont produites par rupture des liaisons phosphodiester entre le phosphate et le désoxyribose ou plus fréquemment au niveau de la liaison base-désoxyribose. Cette cassure est produite par l'intermédiaire des radicaux OH° . Les extrémités cassées du brin s'écartent de l'autre brin du fait de la pénétration des molécules d'eau dans la brèche et de la rupture des liaisons entre les bases (liaisons hydrogènes). Le nombre de ces ruptures est plus élevé dans les cellules bien oxygénées que dans les cellules hypoxiques. Les lésions de ce type sont généralement réparables.

Les cassures double brin (CDB)

Les cassures doubles brin (CDB) sont constituées de deux cassures, chacune d'elles étant située en vis-à-vis sur un brin différent de l'ADN. Elles correspondent à la rupture simultanée des deux brins d'ADN, à des niveaux distants de moins de 3 nucléotides environ. Elles peuvent résulter d'un événement ionisant touchant les deux brins simultanément ou de deux cassures simple brin indépendantes. Les CDB sont les lésions les plus délétères. Cependant, elles ne sont pas nécessairement létales et certaines peuvent être réparées.

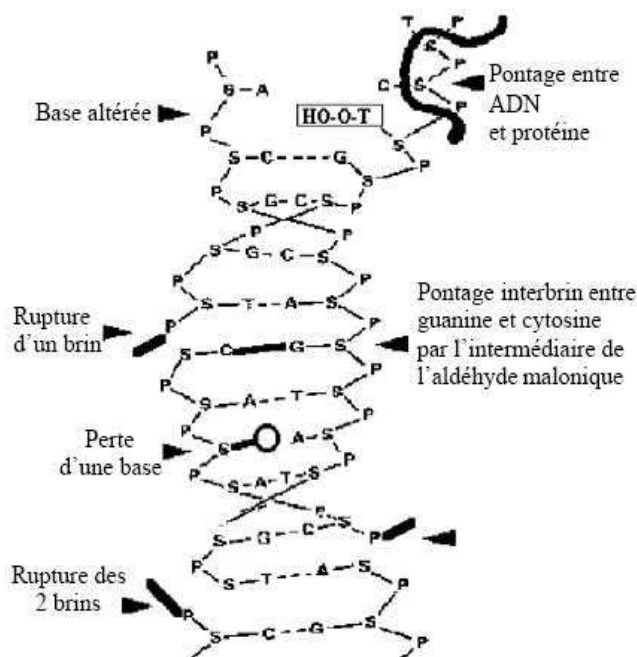


Figure 15 : Exemples de lésions d'ADN.

- Formation de pontages entre les brins de l'ADN ou avec les protéines

On peut assister également à la formation de pontages intra- ou inter-brins sur l'ADN, par fusion entre deux ruptures de brins. Ces ponts d'ADN aboutissent à des aberrations chromosomiques. Les radiations induisent également des associations de protéines avec l'ADN (Jenner et al., 1998). Ces associations ADN/protéine impliquent surtout la thymine et la tyrosine mais d'autres bases ont aussi été identifiées. De plus, certains composés, comme le malondialdéhyde provenant de la peroxydation de la membrane plasmique après irradiation, peuvent également induire ces pontages de protéines sur l'ADN. Ces ajouts de protéines modifient la structure de la molécule et donc son fonctionnement.

- Sites de dommages multiples (LMDS locally multiply damages sites)

Les LMDS consistent en un grand nombre de lésions simples (dommages aux bases, CSB, CDB et associations ADN/protéine ou ADN/ADN), produites à proximité les unes des autres, sur une courte séquence de la molécule d'ADN (Goodhead et al., 1994, Sutherland et al., 2001). Ces associations ou "clusters" de dommages sont la conséquence d'une accumulation de plusieurs lésions sublétales individuelles. Plus ils sont complexes, moins ils sont réparables par la cellule.

III. Les conséquences des lésions d'ADN

Suivant la gravité des lésions, leur étendue et leur position sur les brins d'ADN, les conséquences pour la cellule seront différentes. Si les lésions sont peu importantes, la cellule va réparer ces dommages. Si la réparation est fidèle, l'effet du stress est nul. Par contre, une absence de réparation ou une réparation incorrecte conduit à une accumulation des lésions dans l'ADN. Ces lésions, si elles touchent la partie codante d'un gène, peuvent avoir des conséquences fonctionnelles. D'autres lésions plus graves et plus nombreuses ou induites par la réparation peuvent également modifier la morphologie des chromosomes et induire des aberrations chromosomiques (translocations, délétions, inversions, anomalies génétiques (anneaux dicentriques, centriques et acentriques)).

III.1. Les mécanismes de réparation des lésions d'ADN

Les systèmes de réparation de l'ADN diffèrent selon le type de lésion. Ils sont basés sur le même principe : reconnaissance de la lésion grâce à des protéines (DNA-PK, H2AX, le complexe MRN ((MRE11 (Meiotic Recombination 11), RAD50, NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1))), qui vont s'arrêter au niveau de la lésion et en recruter d'autres, et enclencher une série de cascades enzymatiques aboutissant à la réparation de l'ADN. Chez les eucaryotes, les principaux mécanismes de réparation sont : NER (Nucléotide Excision Repair), BER (Base Excision Repair), NHEJ (Non Homologous End Joining) et HR (Homologous Recombination) (Sancar et al., 2004, Sengupta et al., 2005).

III.1.1. Réparation par excision de bases (BER, Base Excision Repair)

Elle sert principalement à remplacer les bases modifiées ou combler les sites vacants laissés par une perte de base et intervient aussi après induction des CSB (Wilson et al., 2003). Lorsque la lésion est détectée, si ce n'est pas déjà le cas, des glycosylases coupent la liaison glycosidique créant ainsi un site abasique (nucléotide dépuriné/dépyrimidiné par hydrolyse du lien N-glycosidique). Puis, dans la version simple (short-patch), un seul nucléotide est ajouté et ligaturé alors que dans sa version plus complexe (long-patch) plusieurs nucléotides viennent remplacer les anciens. Les nucléotides déplacés formant un petit oligonucléotide sont éliminés par l'endonucléase FEN-1 (Figure 16). La PARP qui détecte les dommages peut activer ce système de réparation et y jouer un rôle (Dantzer et al., 1999). Ces lésions n'impliquant qu'un seul brin d'ADN sont en général correctement et rapidement réparées par simple réplication du brin opposé via la complémentarité des bases impliquées dans la lésion.

III.1.2. Réparation par excision de nucléotides (NER, Nucleotide Excision Repair)

Le NER est un mécanisme qui peut agir sur des lésions encombrantes et gênant la structure de l'ADN comme les dimères de pyrimides et autres modifications causées par les UV et par des agents mutagènes (Friedberg et al., 1995). Il s'agit d'un mécanisme très conservé qui comprend quatre étapes (Figure 16): (1) la lésion sur l'ADN est détectée; (2) l'ADN entourant la région affectée est déroulé par l'arrivée du complexe TFIIH; (3) des endonucléases (ERCC1-XPF et XPG) génèrent des coupures simple brin aux extrémités 5' et 3' du site de

dommage; 4) finalement l'ADN polymérase vient combler le site laissé vacant en ajoutant les nucléotides adéquats.

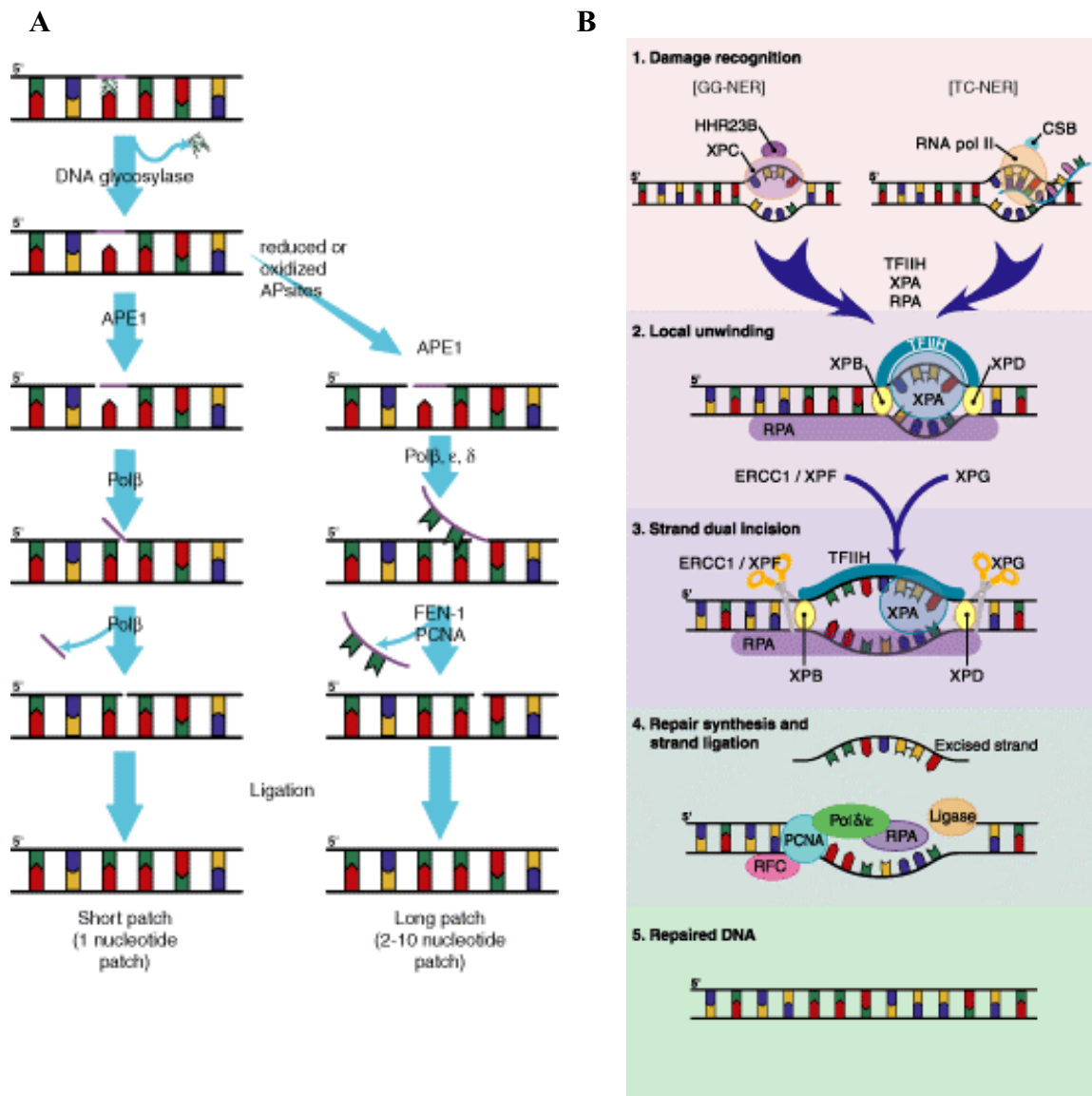


Figure 16 : Systèmes de réparation (A) BER (B) NER.

Les CDB affectent les deux brins de l'ADN ce qui empêche l'utilisation du second brin comme modèle pour la réparation. Les deux principaux mécanismes permettant à une cellule de réparer ces lésions majeures sont la recombinaison homologue et le NHEJ. Cependant, des variations légèrement différentes existent comme l'appariement par extrémités protubérantes simple brin (SSA) (Valerie et al., 2003).

Le choix entre ces deux mécanismes de réparation semble être influencé par la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule lors de l'induction des dommages (Takata et al., 1998).

III.1.3. La réparation par recombinaison homologue, HRR

Elle implique l'échange et « l'invasion » de brins provenant du chromosome endommagé dans ceux d'un chromosome homologue intact. Ce mode de réparation corrige les CDB sans induire d'erreurs. Il s'agit d'un processus complexe nécessitant l'action de plus d'une dizaine de protéines qui prédomine en fin de phase S et en phase G2 du cycle cellulaire, lorsque les chromatides soeurs sont disponibles. Tout d'abord, il y a reconnaissance des extrémités libres de la CDB par les protéines du complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1). En premier lieu, les kinases ATM/ATR ainsi que le complexe MRN reconnaissent les extrémités libres et sont recrutés au site de cassure. Elles produisent ensuite, par activité exonucléase, des extrémités terminales 3' simple brin (Jager et al., 2002). A l'extrémité de ces simples brins se fixent des protéines RAD52 (Ristic et al., 2003). Puis les protéines RAD51 et RPA ("Replication Protein A", protéine qui lie les simples brins chez l'homme) se lient à l'ADN simple brin, pour former un complexe nucléoprotéique qui favorise l'appariement avec l'ADN de la chromatide soeur sur le chromosome homologue. Suite à cet appariement, une ADN polymérase synthétise et allonge chaque brin d'ADN puis l'ADN ligase I lie les extrémités. Un échange de brins entre les deux chromosomes peut s'effectuer (Peterson et al., 2004) (Figure 17).

III.1.4. La suture non homologue des extrémités, NHEJ

Il s'agit d'une ligation d'extrémité à extrémité d'ADN qui ne requiert pas le chromosome homologue pour la réparation. Les pertes de séquences et/ou les mutations introduites sont courantes, comparativement avec la recombinaison homologue, et cette réparation est donc imparfaite. Malgré cela, elle intervient dans la réparation de la plupart des CDB. Elle est importante durant la phase G0/G1 et le début de la phase S (Lee et al., 1997). Au début du processus, la protéine hétérodimérique Ku70/Ku80 se lie aux extrémités libres de l'ADN et recrute au niveau de ce site d'autres facteurs : la DNA-PKcs, la protéine XRCC4 (X-ray Repair Cross Complementing genes) et l'ADN ligase IV. La DNA-PK possède une activité kinase qui s'active en se liant aux extrémités de l'ADN et phosphoryle un certain nombre de substrats dont XRCC4, ce qui favorise la réparation. Enfin, une ligase, la Ligase IV, lie les

deux bouts pour reformer la double hélice (Figure 17). D'autres protéines XRCC interviennent dans cette réparation mais leur rôle n'est pas clairement défini (Thacker et al., 2003).

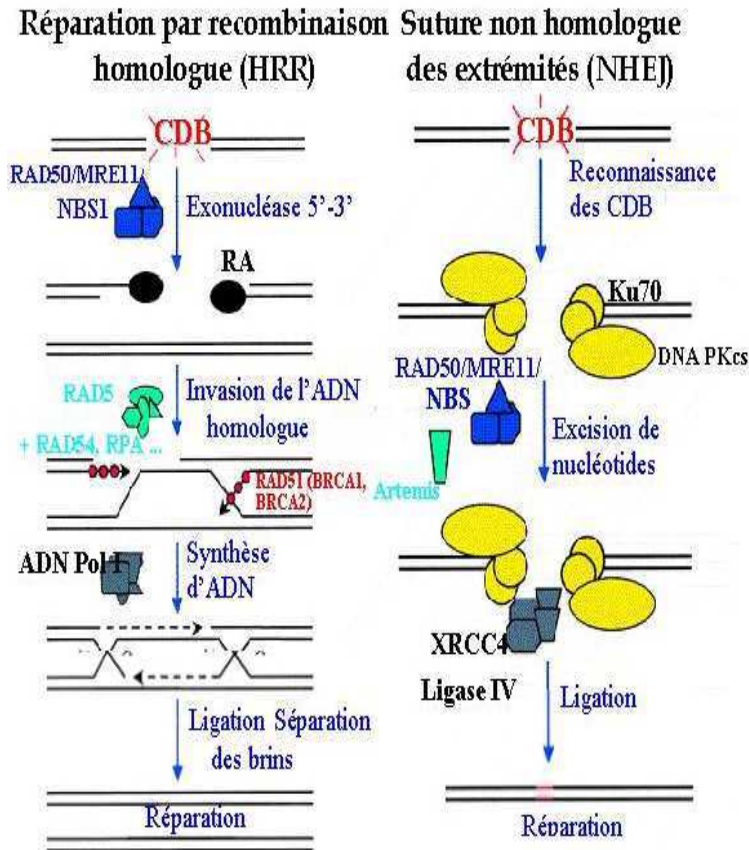


Figure 17 : Les systèmes de réparation des cassures doubles brins CDB (D'après (Jackson et al., 2002)).

IV. Détection des dommages d'ADN

Les dommages de l'ADN sont détectés par des protéines communément appelées « senseurs ». Il s'agit des protéines de la famille phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases (PI3Ks): ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), ATR ("Ataxia-Telangiectasia RAD3-related") et DNA-PK ("DNA-dependent Protein Kinase"). Elles surveillent l'ADN, détectent les lésions et régulent les réponses cellulaires à ces dommages, en phosphorylant un certain nombre de protéines cibles, ce qui va déterminer la réponse cellulaire. Elles interviennent également dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la protéine ATM du fait qu'elle est spécialement activée après traitement des cellules par les agents chimiothérapeutiques. C'est une protéine de 350 kDa, exprimée d'une façon ubiquitaire (Savitsky et al., 1995). Sa localisation cellulaire prédominante est nucléaire mais elle est également retrouvée dans le cytoplasme liée à la β -adaptine (Lim et al., 1998).

IV.1. La kinase ATM

IV.1.1. Le gène *ATM*

Le gène *ATM* est localisé dans la région chromosomique 11q22-23 (Gatti et al., 1988). Il est composé de 66 exons dont 62 codants. *ATM* l'est un des gènes contenant le plus grand nombre d'exons parmi les gènes humains actuellement rapportés. L'ensemble de ses exons est réparti dans une région génomique relativement compacte de 180 kb. Le transcrit majoritairement produit a une taille de 13 kb, est ubiquitaire et code une protéine de 3056 acides aminés (aa), soit 350 kDa. Il existe des épissages alternatifs dans la partie 5' ne concernant que les exons 1a à 3, qui ne sont pas codants. La taille de ces transcrits alternatifs peut varier de 146 pb à 844 pb, mais aucun n'a d'impact sur la taille de la protéine *ATM*. Un seul codon d'initiation de traduction, situé dans l'exon 4, permet la synthèse d'une protéine complète.

La diversité de composition de la partie 5' UTR permettrait de réguler la traduction des différents transcrits en échappant à certains facteurs d'inhibition de traduction ou, au contraire, en facilitant l'accès aux ribosomes au codon d'initiation de traduction (Savitsky et al., 1997). Il existe également une diversité de taille et de composition en séquence de régulation d'expression dans la partie 3'UTR des transcrits. Ces séquences permettraient des liaisons à certains facteurs de régulation qui protégeraient l'ARNm de la dégradation. On observe également la présence de sites de polyadénylation alternatifs qui permettraient de réguler le niveau d'expression cellulaire et la localisation intracellulaire des différents transcrits (Savitsky et al., 1997).

IV.1.2. Structure de la protéine ATM

ATM fait partie d'une famille de protéines apparentées aux Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, comme ATR, SMG1/ATX, m-TOR/FRAP, DNA-PK chez les mammifères, et Mec1, Tel1 et

Rad53 chez la levure. La protéine ATM possède en position C-terminale un domaine kinase fonctionnel homologue de la famille phosphatidylinositol 3-kinase (entre les acides aminés 2865 à 2900) intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire et la stabilité chromosomique ainsi qu'un autre domaine plus proximal homologue de RAD3. Un motif Leucine Zipper (LZ) est aussi décrit dans la protéine ATM et certains de ses homologues.

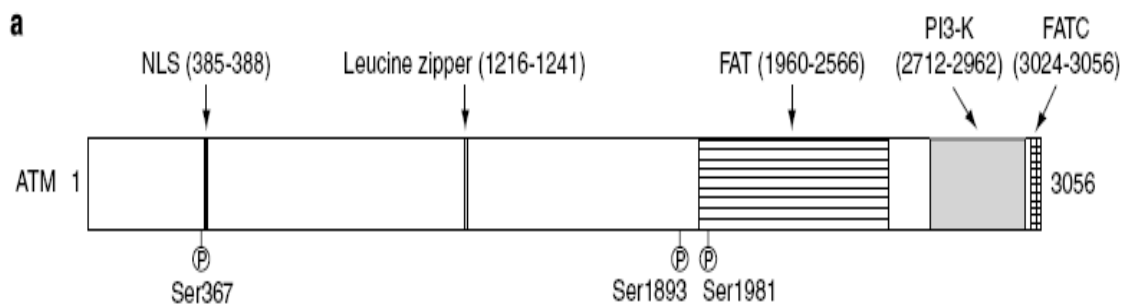


Figure 18 : Représentation schématique de la structure de la protéine ATM. Leucine zipper (LZ) , FRAP/ATM/TRRAP (FAT), Kinase domaine (PI3-K), FAT C-terminal (FATC) (D'après (Lee et al., 2007)).

Les études *in vitro* de mutagenèse dirigée, délétant le domaine LZ et les séquences adjacentes, ont montré que ce domaine n'était pas nécessaire pour la dimérisation d'ATM et n'avait pas d'effet sur l'activation d'ATM. En revanche, la survie cellulaire après exposition à des radiations ionisantes est altérée, suggérant que le domaine LZ est indispensable au bon fonctionnement d'ATM (Chen et al., 2003). ATM est pourvue d'un domaine FAT(FRAP/ATM/TRRAP) situé entre les acides aminés 1960 à 2566 (Bosotti et al., 2000) et un autre domaine de 35 aa, appelé FATC (FAT C-terminal), retrouvé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Bien que la fonction des domaines FAT et FATC reste encore à déterminer, il est possible qu'ils se replient l'un sur l'autre dans une configuration permettant d'assurer le fonctionnement du domaine PI-kinase d'ATM qui est situé entre les deux domaines (Figure 18). L'autophosphorylation d'ATM sur la Sérine 1981 pourrait alors se faire (Bakkenist & Kastan, 2003). La partie N-terminale serait impliquée dans le recrutement et l'interaction avec les protéines cibles d'ATM (Fernandes et al., 2005).

IV.I.3. Rôles et substrats d'ATM

La protéine ATM est présente principalement dans les noyaux des cellules en division. Ses cibles de phosphorylation sont les Sérine et les Thréonine suivies d'une Glutamine (motifs SQ/TQ). ATM joue le rôle de transducteur du signal de réparation d'altérations de l'ADN, essentiellement les CDB. D'une manière générale, ATM est impliquée dans la balance entre l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation des DSBs (Abraham et al., 2003, Durocher & Jackson, 2001). Elle n'est pas activée en réponse aux UV. Son niveau d'expression ne varie pas même après altération de l'ADN. De la même façon, son niveau d'expression est stable au cours des différentes étapes du cycle cellulaire (Chen et al., 1991, Brown et al., 1997). *In vitro*, ATM reconnaît les extrémités d'ADN et s'y fixe (Smith et al., 1999). L'activité kinase d'ATM augmente rapidement après l'apparition de CDB. Cette rapide augmentation s'explique par la capacité de la protéine à s'autophosphoryler (Bakkenist & Kastan, 2003). En absence d'altérations de l'ADN, les protéines ATM sont présentes à l'état inactif dans les cellules, sous forme de dimères ou de multimères. Le domaine kinase de l'une est bloqué par le domaine FAT de l'autre. Lors d'une cassure de l'ADN, chaque molécule ATM phosphoryle l'autre sur la sérine 1981 située dans le domaine FAT, s'activant mutuellement et se libérant l'une de l'autre (Bakkenist & Kastan, 2003) (Figure 19). Il est possible cependant que d'autres sites de phosphorylation existent dans le domaine FAT. Une étude *in vitro*, a mis en évidence la présence de dimères d'ATM reconstitués à partir de mutants non phosphorylables (Lee & Paull, 2005).

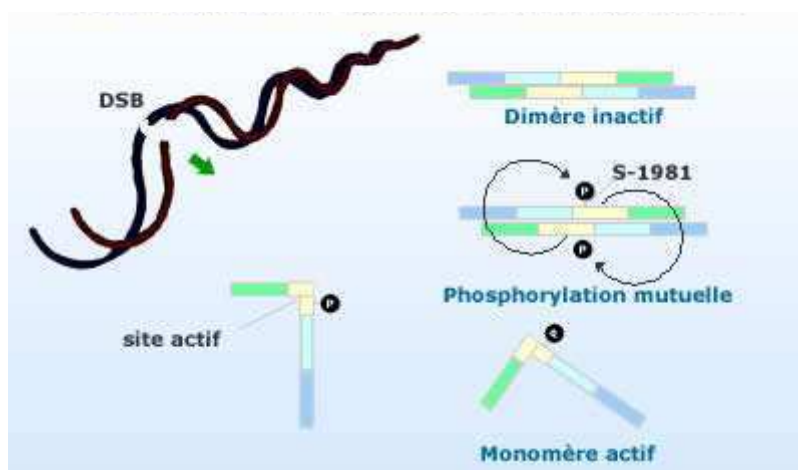


Figure 19 : Représentation schématique de l'activation d'ATM.

Les principales cibles de phosphorylation (Shiloh et al., 2003) sont des protéines clés des différents points de contrôle du cycle cellulaire, des protéines chromatinienne modifiant l'accès aux sites ADN à réparer, de protéines directement ou indirectement impliquées dans la réparation des lésions de l'ADN. Après activation, ATM phosphoryle d'autres substrats, tels que p53BP1 (p53 Binding Protein 1), MDC1 (Mediator of DNA damage Checkpoint Protein 1), SMC1 (Structural Maintenance of Chromosom 1), H2AX (Histone 2A family member X), NBS1, MRE11, p53, BRCA1, FANCD2 (Fanconi Anemia, Complementation Group D2) et Chk2 (Kobayashi et al., 2004, Sancar et al., 2004). L'autoactivation et la phosphorylation d'ATM sont dépendantes du complexe MRN. En effet, NBS1 assure l'interaction entre ATM et l'ADN (Cerosaletti et al., 2006) et sa phosphorylation est requise pour que ATM phosphoryle d'autres substrats comme Chk2 ou H2AX (Lee & Paull, 2004). Le complexe MNR activé par ATM (Phosphorylation de NBS1) joue le rôle d'un amplificateur de réponse. Ceci montre une interdépendance entre ATM et le complexe MRN, qui peuvent chacun intervenir à plusieurs niveaux dans la détection des cassures doubles brins. ATM peut également phosphoryler certains résidus sérine de MDM2, l'inhibiteur du suppresseur de tumeur p53, suite à différents stress génotoxiques (Khosravi et al., 1999), induisant une diminution de l'export nucléaire de p53 (Maya et al., 2001). ATM peut interagir avec la tyrosine kinase c-Abl via ses résidus 1373 à 1382 (Shafman et al., 1997). De plus, il a été montré que la phosphorylation de c-Abl par ATM sur la Sérine 465 conduit à l'activation de c-Abl (Baskaran et al., 1997).

IV.1.4. Pathologies liées à ATM

Le spectre des mutations identifiées chez les enfants AT est très large et disséminé sur l'ensemble du gène. Il s'agit dans la majorité des cas de mutations inactivatrices conduisant à un codon stop, faux-sens, une insertion ou une délétion ne rompant pas le cadre de lecture. Aucun point chaud de mutation n'a été décrit. La déficience en protéine ATM est à l'origine de la maladie neurodégénérative ataxia-telangiectasia (AT) qui se transmet sur le mode autosomal récessif et qui est caractérisée par une dégénérescence nerveuse, une immunodéficience et une prédisposition pour le cancer (lymphomes et leucémies). Au niveau cellulaire, cette maladie se manifeste par une instabilité chromosomique et par une sensibilité accrue aux radiations ionisantes. Les lignées cellulaires dérivées de certains de ces patients présentent une radiosensibilité sévère et des défauts dans les arrêts de cycle G1/S et G2/M.

Dans ces lignées, ATR prend le relais et est activée tardivement par les rayons X entre 4 et 8 heures après irradiation (Foray et al., 2003).

IV.2. Autres détecteurs des lésions

Comme ATM, les protéines ATR et DNA-PK sont également essentielles à la signalisation des altérations de l'ADN et à l'activation de certains points de contrôle du cycle cellulaire. La protéine ATR présente des homologies avec ATM et est aussi activée suite aux dommages de l'ADN (Yang et al., 2004a). On considère que les kinases ATM et ATR partagent les mêmes substrats, mais qu'elles ne répondent pas aux mêmes types de lésions. Ainsi ATM est activée par irradiation γ ou exposition aux drogues, tandis qu'ATR est activée en cas d'irradiation UV. Les activités d'ATM et de DNA-PK quant à elles, peuvent être partiellement redondantes (Wang et al., 2005). La PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase) intervient également dans la surveillance et la détection des dommages de l'ADN (Bouchard et al., 2003). Cette protéine nucléaire se lie rapidement aux CSB et aux CDB et synthétise des poly(ADP-ribose), qui recrutent d'autres protéines comme DNA-PK, p53, p21 et la PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase) elle-même. La PARP permet l'accessibilité de l'ADN endommagé aux enzymes de réparation. Ces différentes protéines assurant la détection des lésions de l'ADN peuvent conduire à l'activation de p53, qui se trouve au centre de toutes ces voies.

C. L'EFFECTEUR P53: L'UN DES ACTEURS DE LA REPONSE CELLULAIRE AUX DOMMAGES D'ADN

I. Historique

Un des plus importants gènes suppresseur code pour la protéine p53. C'est en 1979 qu'a été découverte la protéine p53, formant un complexe avec l'antigène grand T de SV40 dans des extraits cellulaires transformés par ce virus (Lane & Crawford., 1979, Linzer & Levine., 1979). Au début, p53 était considéré comme un oncogène parce qu'il est impliqué dans l'immortalisation et la transformation de certaines cellules (Eliyahu et al., 1984; Jenkins et al., 1984). Ce n'est que dix ans plus tard soit en 1989, qu'il est apparu que les clones de p53, contiennent des mutations (Hinds et al., 1989). C'est le gène le plus souvent muté dans les cancers (plus de 50 % des cancers).

II. p53

II.1. Le gène *p53*

Le gène codant pour la protéine p53 humaine est composé de 11 exons. Il est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13.1 (McBride et al., 1986)) et est d'une longueur de 20kb (Figure 20). Chez la souris dont la protéine est identique à 81% à celle de l'humain, le gène p53 est composé également de 11 exons et localisé au niveau du chromosome 11. P53 a été cloné à partir de plusieurs espèces de vertébrés. Le gène p53 possède plusieurs éléments de régulation en 5' de la région codante et à l'intérieur des introns 1 et 4. Il utilise un promoteur P1 situé en amont de l'exon 1 qui conduit à la forme entière de p53.

II. 2. La protéine p53

P53, décrit comme « le gardien du génome » (Lane et al., 1992), est le prototype de suppresseur de tumeur. En effet, des souris déficientes en p53 sont caractérisées par une grande incidence de développement de tumeurs (Donehower et al., 1996) et les fibroblastes de souris (MEF) déficientes p53 présentent des anomalies chromosomiques dues à la réplication des centrosomes (Kramer et al., 2001). C'est un facteur de transcription ubiquitaire activé lorsqu'une cellule subit un stress. Il permet d'induire des réponses antiprolifératives comme l'arrêt de sa croissance, l'entrée en sénescence voire la destruction de la cellule, par activation de la transcription des gènes cibles de p53 (Levine et al., 1997). Sa capacité à induire l'apoptose est d'ailleurs responsable de son activité de suppresseur de tumeur. P53 intervient également dans le développement (Choi & donehower, 1999).

II.2.1. Structure de la protéine p53

La structure de p53 comprend chez l'humain 393 acides aminés et est constituée de 4 domaines structuraux et fonctionnels principaux (Figure 20):

- Le domaine de transactivation

Le premier domaine correspond aux premiers 80 acides aminés de la région amino-terminale (N-terminal) de la protéine. Il est constitué de deux domaines de transactivation fonctionnant de manière indépendante. Ils s'étendent respectivement des acides aminés 1 à 42 et 43 à 63. Ils ont été montrés comme capables d'interagir avec différents facteurs impliqués dans la transcription (Lu et al., 1995). Une région riche en proline sépare les deux premiers domaines

fonctionnels, et s'étend des acides aminés 60 à 90. Cette région comprend 5 motifs de type PXXP (où P=proline et X=n'importe quel acide aminé) et a été montré comme nécessaire à l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose induite par p53. Cette région ne semble pas directement impliquée dans l'action transactivatrice de p53 mais participerait plutôt à la régulation de sa stabilisation (Dorman et al., 2003a).

- Le domaine de liaison à l'ADN

La région centrale correspond au domaine de liaison de p53 à l'ADN. Il s'étend des acides aminés 102 à 292. C'est dans la séquence codant ce domaine que se situent les principales mutations rencontrées dans 50% des tumeurs humaines (Hollstein et al., 1994).

- Le domaine d'oligomérisation

Un signal de localisation nucléaire sépare le domaine de liaison à l'ADN du troisième domaine fonctionnel de la protéine, qui permet son oligomérisation. En effet p53 lie l'ADN sous forme de tétramère. Il correspond aux acides aminés 323 à 356. Un signal d'export a été également découvert dans cette région (Hupp et al., 1994, Jeffery et al., 1995).

- Le domaine carboxy-terminal de régulation de la liaison à l'ADN

La partie carboxy-terminale (C-terminal) de la protéine p53 constitue le quatrième domaine fonctionnel. Il correspond aux 26 derniers acides aminés et est capable de lier l'ADN clivé suite à un stress génotoxique, et permet donc de réguler la liaison p53 à l'ADN via son domaine central. Il a par ailleurs été démontré que la phosphorylation de certains résidus sérine localisés dans le domaine, sa délétion, ou encore sa liaison à l'anticorps pAB421 permet une liaison constitutive de la région centrale de p53 à l'ADN (Hupp et al., 1994, Lee et al., 1995).

P53 peut former des tétramères (Levine et al., 1989, Stenger et al., 1992). Et c'est sous forme tétramérique que p53 se lie aux deux motifs du consensus (Hainaut et al., 1994, Hupp et al., 1994) 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GpyPyPy-3' séparés par 0 à 13 paires de bases (el-Deiry et al., 1992). Le monomère, bien qu'ayant une activité transactivatrice ne peut pas se lier au niveau de l'ADN.

II.2.2. Altérations de p53 et cancer

L'altération du gène p53 se retrouve dans plus de la moitié des cancers humains (Hollstein et al., 1991) et son domaine central (102-292) regroupe à lui seul 90 % des mutations. L'inactivation de p53 est souvent causée par des mutations ponctuelles faux-sens de certains codons clés (Hollstein et al., 1991), particulièrement les codons 175, 248 et 273 (Figure 20). Ces derniers sont considérés comme des points chauds (hot spots) car ils sont les plus fréquemment mutés dans la séquence génique de p53 et sont en cause dans l'émergence de nombreux cancers (Hainaut et al., 2000). L'activité de p53 peut être inhibée par liaison avec des protéines virales. Par exemple, les oncoprotéines E6 des Papillomavirus humains (HPV) et la protéine BZLF1 du virus d'Epstein Barr (EBV), sont capables de se lier à la p53 humaine inhibant ainsi son contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire après dommage de l'ADN (Scheffner et al., 1990, Szekely et al., 1993). Mais ces protéines virales, se liant toutes à la p53, développent des stratégies très différentes pour l'inhiber.

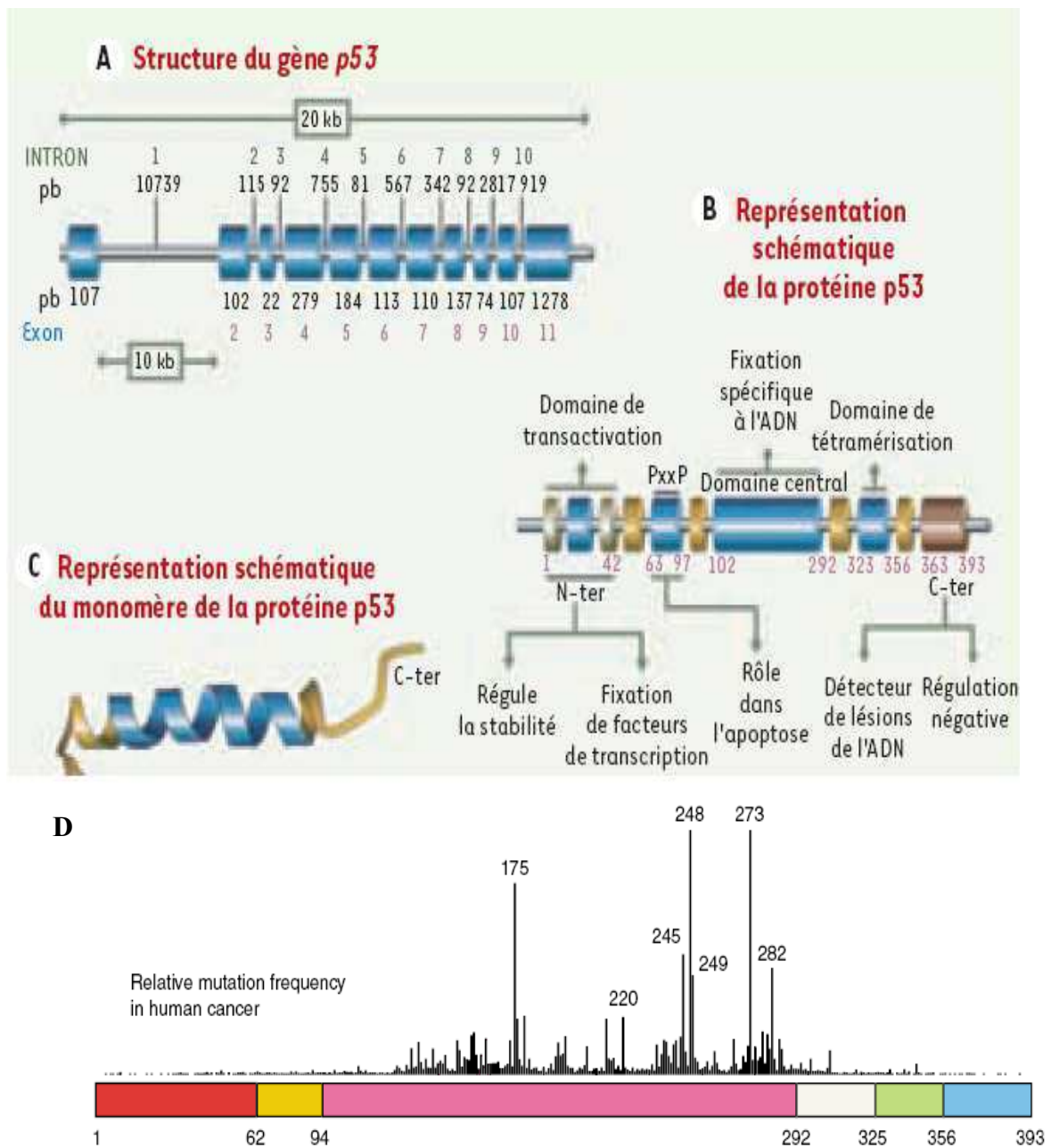


Figure 20 : Structure du gène (A) et de la protéine (B) p53. (C) Représentation du monomère de p53 (D'après (Dridi et al., 2006)) (D) Représentation des mutations « points chauds » situées dans le domaine central de fixation à l'ADN (D'après (Joerger et al., 2007)).

III. La régulation de p53

L'expression et l'activité de la protéine p53 sont régulées négativement dans les cellules normales car son activation inappropriée causerait la sénescence et la mort cellulaire de cellules saines (Stommel & Wahl, 2005). De par sa propriété de suppresseur de tumeur, p53 est impliquée dans la réponse cellulaire induite par un stress génotoxique, pouvant induire le processus tumoral. Afin de permettre une réponse efficace et surtout adaptée à l'état dans lequel se trouve la cellule au moment du stress, l'activité et la stabilité de p53 sont strictement régulées (Volgstein et al., 2000).

Dans les conditions normales, la protéine p53 est en état de latence. Son niveau d'expression basal est relativement bas et sa demi-vie est de 10 à 15 min. La régulation de p53 se fait de façon quantitative aux niveaux transcriptionnel et traductionnel et de façon qualitative par des modifications post-traductionnelles.

III.1. Régulation au niveau transcriptionnel et traductionnel

P53 possède deux promoteurs : P1 situé en amont du site d'initiation de la transcription et qui comporte une CAAT box au lieu de TATA-box et un autre P2 localisé dans son premier intron (Reisman et al., 1988, Tuck & Crawford, 1989). La transcription de p53 est régulée par des facteurs de transcription de la famille hélice-double-hélice tel que par c-Myc (Ronen et al., 1991, Reisman et al., 1988). P53 peut également réguler la transcription de son propre gène. Il a été montré qu'il existe une différence d'abondance des facteurs de transcription liés au promoteur de p53 en fonction qu'il s'agisse de tissu sain ou tumoral (Nayak & Das, 1997). Les niveaux normaux de l'ARNm et de la protéine p53 sont très bas et difficiles à mesurer de façon précise (Volgelstein et al., 2000). Il a été démontré que la quantité de p53 augmente rapidement après un stress cellulaire (Fritsche et al., 1993, Lu et al., 1993, Kastan et al., 1991). En raison de cette rapidité de réponse, il a été supposé que la régulation traductionnelle se fait par une augmentation de la traduction de l'ARNm de p53 (Fu et al., 1996). Les deux extrémités 3'UTR et 5'UTR de l'ARNm de p53 participent à la régulation de la traduction par la fixation de facteurs de transcriptions Cis ou Trans (Halaby et al., 2007). 3'UTR est impliquée dans la régulation négative de la traduction de p53.

P53 est capable de s'autoréguler en se liant à son propre ARNm (Mosner et al., 1995). D'autres études suggèrent que l'augmentation du niveau de p53 dans la cellule est

probablement due à la stabilisation de la protéine. Celle-ci peut être obtenue par plusieurs mécanismes comme la phosphorylation/déphosphorylation, l'oxydoréduction et la liaison à des bouts d'ADN simple brin (Une seule cassure de l'ADN est suffisante pour induire p53). Le traitement de cellules par un inhibiteur de sérine phosphatase induit l'hyperphosphorylation de p53 et l'augmentation de sa quantité. Cependant, l'augmentation du taux de p53 n'est pas suffisant pour induire son activité transcriptionnelle.

III.2. Régulation par des modifications post-traductionnelles

III.2.1. Dans les cellules normales non stressées

III.2.1.1. L'ubiquitylation par MDM2

Des études *in vitro* ayant montré que la stabilité de p53 était régulée par la machinerie protéolytique dépendant de l'ubiquitine (Chowdary et al., 1994), l'hypothèse selon laquelle un facteur cellulaire capable de réguler p53 par la voie du protéasome a été formulée. Cette hypothèse fut confirmée par l'étude de la protéine connue sous le nom de MDM2 (Mouse 3T3 cell Double Minute 2), capable de jouer ce rôle (Haupt et al., 1997, Kubbutat et al., 1997).

La dégradation de p53 est sous le contrôle de la protéine MDM2 (Deb et al., 2002), son principal régulateur, dont l'expression dépend de p53 (Juven et al., 1993, Bargonetti & Manfredi, 2002). Une augmentation de l'activité de p53 augmentera systématiquement l'expression de MDM2 au niveau ARN (régulation transcriptionnelle) et protéique. MDM2 se fixe à l'extrémité N-terminale de p53 et bloque le domaine de transactivation, ce qui favorise l'export nucléaire de p53 (Gu et al., 2001). MDM2 agit en tant qu'ubiquitine ligase en favorisant l'addition de résidus ubiquitine au niveau de son extrémité C-terminale (Haupt et al., 1997) et sa dégradation protéolytique au niveau du protéasome 26S (Chowdary et al., 1994, Yang et al., 2004b). Ainsi, il existe un circuit auto-régulateur de p53 et MDM2, ces deux protéines contrôlant mutuellement leur niveau d'expression.

La protéine MDM2 a initialement été identifiée chez la souris comme gène amplifié au niveau des chromosomes double minute de cellules murines transformées BalbC/3T3 ; c'est la raison pour laquelle elle a été nommée MDM2. Le gène codant MDM2 est amplifié dans 5 à 10% des tumeurs humaines, en particulier dans des sarcomes affectant les tissus mous, et présente les caractéristiques d'une protéine oncogénique (Oliner et al., 1992, Finlay et al., 1992). MDM2 comprend deux domaines principaux : un domaine N-terminal lui permettant de lier

p53 (Oliner et al., 1993), et un domaine C-terminal de type "RING finger H2" (Fang et al., 2000). Elle comprend également un motif de type doigt de zinc dont la fonction est inconnue ainsi que des signaux d'export (Roth et al., 1998) et de localisation nucléaire (Chen et al., 1995). Un signal de localisation nucléolaire a également été identifié dans le domaine de type "RING finger H2" (Lohrum et al., 2000). MDM2 est une protéine qui transite continuellement du noyau au cytoplasme (Roth et al., 1998). Elle régule négativement p53 en agissant à deux niveaux (i) en se liant par son domaine N-terminal au domaine de transactivation de p53, MDM2 l'empêche d'activer la transcription de ses gènes-cibles (Momand et al., 1992, Oliner et al., 1993), (ii) en induisant la dégradation de P53 par la machinerie protéolytique dépendant de l'ubiquitine (Haupt et al., 1997, Kubbutat et al., 1997). MDM2 présente une activité de ligase de groupements ubiquitine de type E3. Le complexe MDM2/p53 (ubiquitinylé) migre dans le cytoplasme et s'y accumule (Roth et al., 1998, Geyer et al., 2000) pour y être protéolysé via la sous-unité 26S du protéasome (Honda et al., 1997, Fang et al., 2000). L'export nucléaire du complexe requiert la liaison de MDM2 à p53 mais pas le signal d'export nucléaire de MDM2 (Roth et al., 1998, Geyer et al., 2000). Un signal d'export nucléaire identifié dans le domaine de tétramérisation de p53 a été montré comme nécessaire et suffisant pour l'export nucléaire du complexe (Stommel et al., 1999, Geyer et al., 2000). Enfin dans le cas où le taux nucléaire de MDM2 est élevé, la dégradation de p53 ne passe pas par son export nucléaire : dans ce cas MDM2 va induire l'ubiquitination de p53 qui sera dégradé au sein même du noyau par le protéasome nucléaire (Li et al., 2003, Shmueli & Oren, 2004). Récemment, une étude a montré que le taux de MDM2, et donc le degré d'ubiquitination de p53, jouerait un rôle dans la balance entre l'export nucléaire de p53 et sa dégradation. Le modèle (Figure 21) proposé stipule que (i) à de faibles taux de MDM2, p53 est monoubiquitinilé ce qui favorise le recrutement d'autres E3 ligases (PIAS) et la dissociation du complexe p53/MDM2, permettant ainsi l'export de p53 (ii) quand il existe des taux élevés de MDM2, p53 est polyubiquitinilé et dégradé (Figure 21)

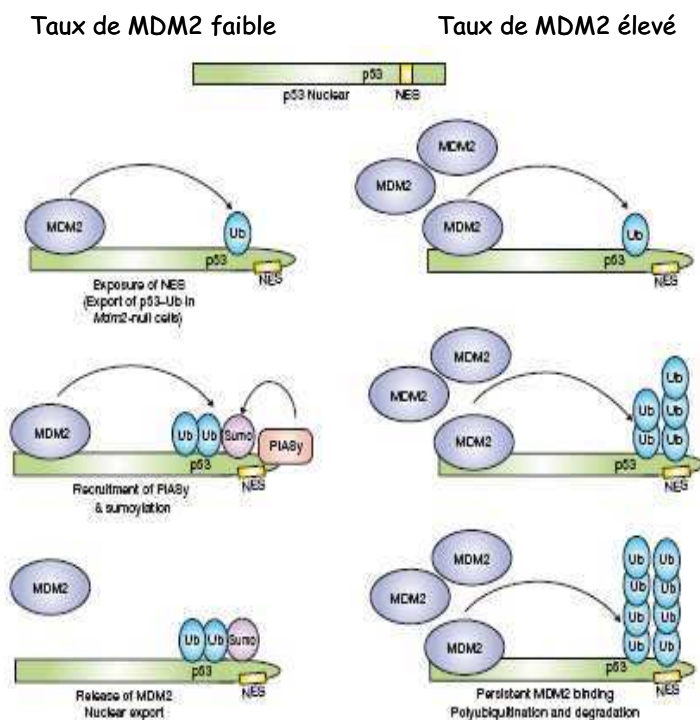


Figure 21 : Représentation schématique du modèle de régulation de l'export nucléaire de p53 par MDM2. L'ubiquitination de p53 révèle la séquence NES et favorise l'export de p53. A des taux faibles de MDM2, p53 recrute l'autre E3kinase : PIASy ce qui induit la libération de MDM2 et l'export de p53. Quand MDM2 est présent à des taux élevés, p53 est ubiquitinilé massivement ce qui mène à sa dégradation (D'après (Li et al., 2003)).

De plus, MDM2 induit la déacétylation des résidus lysine de p53 localisés dans sa partie C-terminale. Cette déacétylation passe par l'inhibition des fonctions activatrices des protéines p300 et PCAF sur p53, à savoir leur capacité à stimuler la liaison de p53 à l'ADN ainsi qu'à induire son acétylation sur résidus lysine. MDM2 recrute également la protéine histone déacétylase HDAC1, permettant la déacétylation des lysines qui seraient acétylées (Figure 22) (Ito et al., 2002).

Les fonctions de MDM2 peuvent elles-mêmes être négativement régulées. Le cofacteur p300/CBP favorise l'acétylation de MDM2 et inhibe son activité ligase de groupements d'ubiquitine de type E3, favorisant la stabilité de p53 (Yang et al., 2004b). Enfin MDM2 est également capable d'induire sa propre ubiquitination, et consécutivement sa dégradation par la sous-unité 26S du protéasome, ce qui a pour effet de permettre l'accumulation de p53 (Fang et al., 2000).

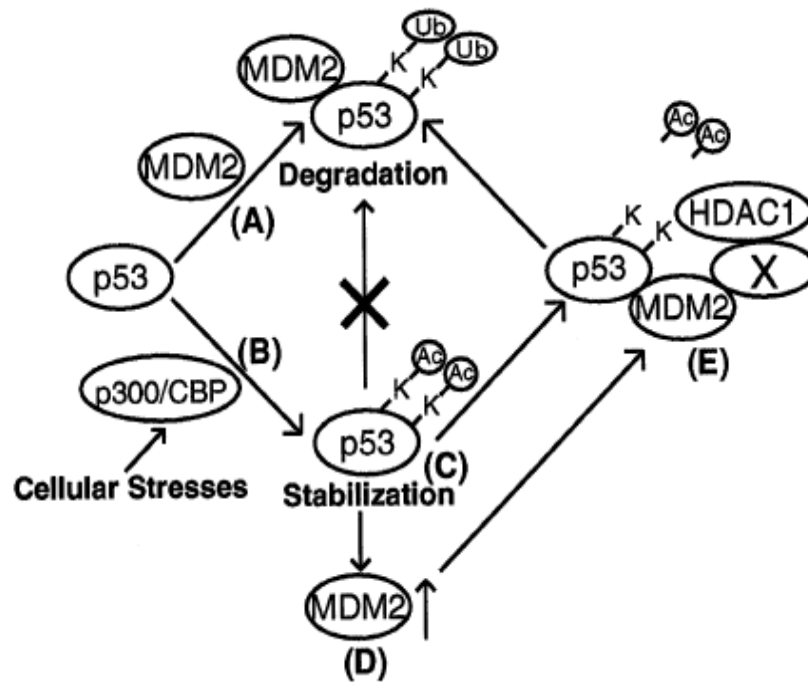


Figure 22 : Modèle de régulation de p53 par MDM2 (A) Dans les conditions normales p53 est ubiquitinilé et dégradé par MDM2 (B) Lors d'un stress cellulaire, P53 est acétylé par p300/CBP(C) L'acétylation de p53 empêche sa dégradation par MDM2 et permet ainsi sa stabilisation (D) P53 activé induit l'expression de MDM2 (E) Le haut niveau de MDM2 permet le recrutement de la désatylase HDAC1 qui va cibler p53. P53 désatylé peut être à nouveau la cible de MDM2 (D'après (Ito et al., 2002)).

III.2.1.2. Autres régulateurs négatifs

Il existe d'autres protéines impliquées dans le contrôle négatif de la stabilité et /ou l'activité de p53. En combinaison avec MDM2, elles peuvent maintenir le niveau protéique de p53 très bas dans la cellule. Il s'agit des protéines Pirh2 (Leng et al., 2003), COP1 (Dornan et al., 2004), Yin Yang 1 (Sui et al., 2004) et ARF-BP1/mule (Chen et al., 2005). Ce sont des E3 ligases, qui comme MDM2 sont capables d'ubiquitiner p53 (Brooks et al., 2006). Pirh2 et COP1 sont également des gènes cibles de p53 et forment une boucle d'autorégulation avec p53 de la même façon que MDM2 (Brooks et al., 2006). Cependant on ignore encore comment et dans quelles conditions ces protéines sont activées.

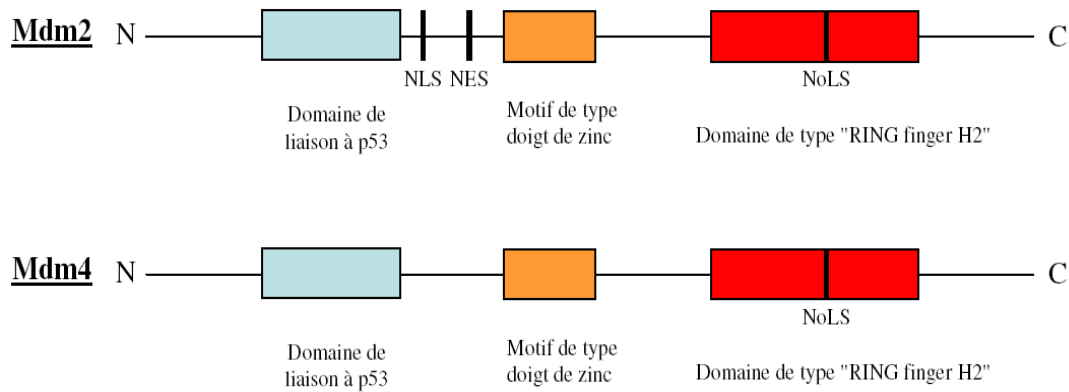
P53 peut être contrôlée de part sa compartimentalisation cellulaire. En 2003, l'équipe de Nikolaev a identifié une nouvelle protéine Parc (p53 Associated, Parkin-like Cytoplasmic protein) (Nikolaev et al., 2003). Cette protéine cytosolique est capable de séquestrer p53 dans le cytoplasme et l'empêchant ainsi d'accomplir ses fonctions de suppresseur de tumeur (Kastan & Zambetti, 2003).

L'activité transcriptionnelle de p53 peut être inhibée par MDM4, protéine similaire à MDM2. MDM4 présente une structure assez proche de celle de MDM2 ; les deux protéines sont représentées dans la Figure 23. Le domaine présentant le plus grand pourcentage d'identités entre MDM4 et MDM2 est le domaine N-terminal, impliqué dans la liaison des deux protéines à p53 (Böttger et al., 1999).

MDM4 inhiberait l'activité transcriptionnelle de p53 par l'induction de l'inhibition de l'acétylation de p53 par le complexe p300/CBP (Sabbatini & McCormick, 2002). Il a été montré que MDM4 peut interagir avec MDM2 via leur domaine de type « ring finger H2 » ; ce qui provoque la stabilisation de MDM2 (Sharp et al., 1999, Tanimura et al., 1999) par l'inhibition de son activité d'auto-ubiquitinylation (Stad et al., 2001) (Figure 23). De manière paradoxale, des expériences de surexpression en lignées cellulaires semblent montrer que MDM4 induirait une stabilisation de p53 via l'inhibition de sa dégradation par MDM2. Ce dernier mécanisme peut être expliqué par le recrutement par MDM2 de MDM4, normalement cytoplasmique, dans le noyau d'où il pourrait tout autant stabiliser p53 (via le blocage de l'export nucléaire de p53 par MDM2, via sa liaison avec MDM2). Il est à noter que le domaine « RING finger H2 » de MDM4 ne lui confère pas d'activité de ligase de type ubiquitine, et donc de dégradation de p53 par la voie du protéasome 26S (Stad et al., 2001,

Migliorini et al., 2002, Kawai et al., 2003). Enfin la stabilité de MDM4 peut également être négativement régulée par MDM2 via son activité de ligase d'ubiquitine (Kawai et al., 2003).

A



B



Figure 23 : (A) Comparaison de la structure des protéines MDM2 et MDM4 (NLS : signal de localisation nucléaire ; NES : signal d'export nucléaire ; NoLS : signal de localisation nucléolaire), (B) Représentation schématique du modèle actuellement admis pour la régulation négative de l'activité transcriptionnelle de p53 par MDM2 et MDM4. Il n'est pas encore clairement établi si l'action régulatrice de MDM4 se fait directement ou via MDM2 (Adapté d'après (Marine & Jochemsen., 2005)).

III.2.2. Activation de p53 après un stress génotoxique

P53 est activé lorsqu'une cellule subit un stress comme les stress génotoxiques, l'hypoxie, les chocs thermiques, les radiations ionisantes, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes, l'absence de facteurs de survie (Graeber et al., 1994, Lowe et al., 1999, Kastan et al., 1991, Vousden et al., 2002). Beaucoup de dommages survenus au niveau de l'ADN peuvent activer p53 telles que les cassures doubles brins induites par les radiations ou les agents anticancéreux. Comme il a été dit précédemment, la protéine p53 est sujette à plusieurs modifications post-

traductionnelles (Figure 24) capables de réguler son activité transcriptionnelle. Ces modifications covalentes régulent l'activité de p53 en affectant son repliement tridimensionnel (Milner & Medcalf, 1991).

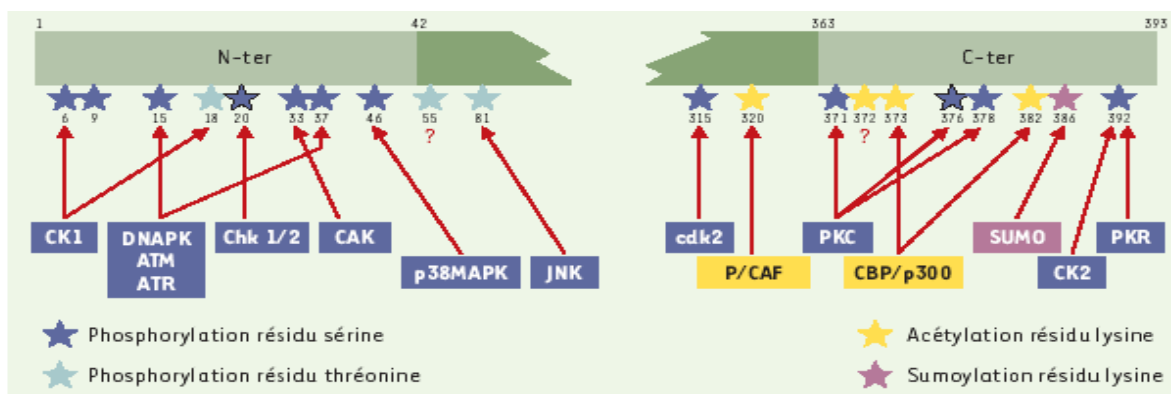


Figure 24 : Représentation schématique des sites de modifications post-traductionnelles et des kinases impliquées (D'après (Le Blanc & May *Médecine et sciences.*, 2002)).

III.2.2.1. La phosphorylation des résidus sérine et thréonine

Certains résidus phosphorylés induisent une diminution de l'interaction entre p53 et MDM2, permettant à p53 d'exercer sa fonction transactivatrice et de ne plus être la cible de l'ubiquitinylation de ses résidus lysine (Zhang & Xiong, 2001). De plus la phosphorylation de certains résidus sérine de p53 permet à celui-ci de s'assembler sous forme tétramérique, masquant le signal d'export nucléaire de p53 et lui permettant de rester dans le noyau (Stommel et al., 1999, Zhang & Xiong, 2001). Chez l'humain au moins 7 sérines et 2 thréonines dans le domaine transactivateur et 5 sérines dans le domaine C-terminal sont susceptibles d'être phosphorylées. Les sérines 15 et 20 ainsi que la thréonine 18 sont des sites de phosphorylation majeurs. La sérine 378 est constitutivement phosphorylée. La thréonine 55 serait phosphorylée à l'état basale et déphosphorylée en réponse aux dommages d'ADN. Différentes kinases sont capables de phosphoryler p53 en fonction du type de stress cellulaire, citons notamment ATM, ATR, p38MAPK, Chk1/2, DNA-PK et PKC (May & May, 1999). Le site de phosphorylation sérine 15, a été décrit comme une cible de phosphorylation *in vivo*, et les mutants p53 en position sérine 15 perdent leur capacité à induire l'arrêt en G1. Ces travaux soulignent le rôle fondamental de la phosphorylation du résidu sérine 15 dans l'activation de la fonction de régulation de l'arrêt en G1 de p53. Néanmoins, la

phosphorylation de p53 par la DNA-PK n'a pu être clairement établie *in vivo*. Fried et ses collaborateurs ont montré que la phosphorylation de p53 par la DNA-PK n'était pas le mécanisme responsable de l'accumulation radio-induite de p53 (Fried et al., 1996). Rathmell et ses collaborateurs ont de plus démontré que la DNA-PK n'était pas indispensable *in vivo* à l'accumulation radio-induite de p53, ni aux arrêts en G1 et G2 (Rathmell et al., 1997). Ces auteurs n'excluent cependant pas la participation de la DNA-PK dans la régulation du cycle cellulaire et suggèrent que la fonction DNA-PK soit redondante et que le résidu sérine 15 puisse être activé par une autre protéine kinase.

ATM et ATR peuvent phosphoryler la sérine 15 de la protéine p53 (sérine 18 chez la souris), ce qui augmente sa liaison avec le complexe p300/CBP (Dumaz et al., 1999) et bloque ainsi sa liaison avec MDM2. Il en résulte une inhibition de sa dégradation et une stabilisation et une accumulation de p53 dans les cellules. ATM induit également la déphosphorylation de la sérine 376 de p53 ce qui stimule son activité transcriptionnelle (Waterman et al., 1998). Les travaux de Hay et ses collaborateurs ont montré qu'en réponse aux radiations, MDM2 est phosphorylée par ATM ce qui interfère avec l'interaction avec p53 et induit l'accumulation de p53 (Hay et al., 2000).

Chk1 /2 sont également deux sérine thréonine kinases qui agissent en aval d'ATM et ATR, et sont impliquées dans la phosphorylation de résidus sérine de l'extrémité N-terminale de p53. Après irradiation des cellules, Chk2 et Chk1 peuvent phosphoryler p53 au niveau de sa sérine 20 en réponse aux irradiations et aux rayons UV respectivement, ce qui induit la dissociation du complexe MDM2/p53 (Hirao et al., 2000, Shieh et al., 2000). Une activation de la protéine kinase C (PKC) dans des cellules tumorales irradiées a également été décrite dans la littérature. Les radiations ionisantes activent les phospholipases PLA₂ et PLD, avec hydrolyse enzymatique de phospholipides, et libération de l'acide arachidonique qui active la PKC. La p53 est un substrat de la PKC qui phosphoryle le résidu sérine 378 de la p53 humaine et les résidus sérine 370 et thréonine 377 de la p53 murine.

III.2.2.2. L'acétylation des résidus lysine

La protéine peut être acétylée en réponse à plusieurs stimuli ce qui augmente considérablement sa stabilité et sa capacité à se lier à l'ADN (Prives & manley, 2001, Sakaguchi et al., 1998). Les lysines concernées sont 320, 373 et 382 et sont localisées dans l'extrémité C-terminale. Elles sont acétylées par des histones acétyltransférases (HAT) spécifiques : CBP et PCAF. Ces enzymes se fixent à la protéine p53 et agissent comme des

coactivateurs (Lill et al., 1997). Il a été montré que la phosphorylation par ATM favorise l'interaction avec ces enzymes ce qui améliore la fixation spécifique de p53 à l'ADN et augmente son activité (Dumaz et al., 1999, Sakaguchi et al., 1998, Luo et al., 2004). L'acétylation et l'ubiquitination peuvent toucher les mêmes résidus, ce qui suggère que l'acétylation jouerait un rôle dans la stabilisation de p53. En effet, Li et collaborateurs ont montré en 2002 que l'acétylation de p53 empêche son ubiquitination par MDM2 et donc sa dégradation dans le protéasome (Li et al., 2002). Quatre ans plus tard, l'équipe de Brooks (Brooks et al., 2006) met en évidence la présence d'une compétition entre l'ubiquitination et l'acétylation après un stress cellulaire.

III.2.2.3. La méthylation

Cette modification concerne une lysine dans l'extrémité C-terminale dont la méthylation est effectuée par l'enzyme Set méthyltransférase. Elle joue un rôle important dans la stabilité de la protéine car elle permet de confiner la protéine p53 dans le noyau l'empêchant ainsi d'aller vers le cytoplasme pour y être dégradée (Chuikov et al., 2004).

III.2.2.4. La SUMOylation des résidus lysine

La SUMOylation du résidu lysine 386 induit l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 (Gostissa et al., 1999, Rodriguez et al., 1999). La SUMOylation est un processus de modification post-traductionnelle qui consiste au transfert d'une protéine proche de l'ubiquitine, SUMO-1, sur des résidus lysine de la protéine ciblée. Ce processus fait intervenir l'enzyme Ubc9, présentant une activité ligase de type ubiquitine E2, suffisante pour permettre la SUMOylation des résidus lysine (Bernier-Villamor et al., 2002). La SUMOylation ne semble pas induire directement la dégradation de la protéine ciblée par la voie du protéasome mais plutôt la capacité de la protéine à interagir avec d'autres facteurs cellulaires (Müller et al., 2004). P53 peut être modifiée au niveau du résidu lysine 386 (lys386), localisé dans la partie carboxy terminale de la protéine. Cette SUMOylation requiert uniquement Ubc9 et SUMO-1 (Gostissa et al., 1999, Rodriguez et al., 1999). La SUMOylation de ce résidu a été montrée comme permettant l'augmentation de la capacité de transactivation de p53 (Gostissa et al., 1999, Rodriguez et al., 1999, Melchior & Hengst, 2002). Cependant, des données plus récentes ne confirment pas cette hypothèse. Il a en effet été montré qu'une interaction directe entre Ubc9 et p53 induisait la SUMOylation de cette dernière, mais que cette interaction était

diminuée par la phosphorylation de ser20 de p53 suite à un stress génotoxique (Lin et al., 2004).

III.2.2.5. Autres régulateurs positifs de p53

a. p14/ARF

ARF : “Alternate Reading Frame” code pour une protéine de 14kD chez l’humain (19kD chez la souris). ARF constitue, comme INK4a, un suppresseur de tumeurs (Sharpless et al., 1999). Ces protéines sont codées par le gène INK4a/ARF et sont traduites à partir d'une deuxième phase de lecture ouverte chevauchant celle codant p16. Les 3 protéines respectivement p16INK4a (codée par le transcrit a), p14ARF et p19ARF (codées par le transcrit b) ou de manière plus générique INK4a (faisant référence à p16INK4a) et ARF (faisant référence à p14ARF ou p19ARF) (Quelle et al., 1995). Les 2 transcrits partagent les mêmes exons 2 et 3, mais diffèrent par leur premier exon (Figure 25).

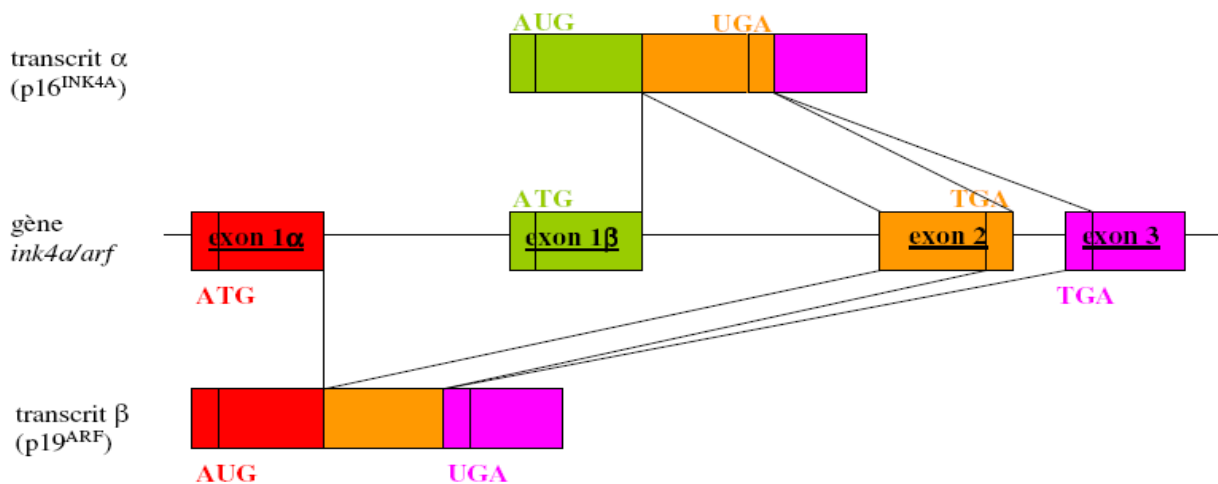


Figure 25 : Représentation schématique du gène *INK4a/ARF* et de ses deux transcrits, le transcrite α (codant la protéine p16INK4a) et le transcrite β (codant la protéine p19ARF).

Des souris déficientes à la fois pour ARF et INK4a (élimination des exons 2 et 3 du gène, communs aux 2 transcrits), ainsi que pour ARF (élimination de l'exon 1b du gène) développent spontanément des tumeurs à l'état homozygote (Serrano et al., 1997, Kamijo et al., 1997). Les MEFs dérivées de ces souris sont immortalisées et l'expression constitutive de

H-Ras induit leur transformation, comme pour les MEF *p53*^{-/-}. C'est le régulateur négatif de MDM2. A l'origine il avait été observé que l'activation d'ARF induisait un arrêt du cycle cellulaire dépendant de la présence de p53, mais qui n'impliquait pas l'inhibition directe des complexes cycline/Cdk ; ces observations suggéraient donc que ARF régule positivement p53. Des données complémentaires ont par la suite permis d'établir que l'activation de p53 suite à l'activation des oncogènes Ras, Myc et E1A (Serrano et al., 1997), dépendait de la présence de ARF, sans modification de l'état de phosphorylation de p53 (Palmero et al., 1998, Weber et al., 1999). Les mécanismes moléculaires par lesquels ARF active p53 ont été déterminés : ARF forme un complexe avec MDM2 (Zhang et al., 1998, Pomerantz et al., 1998, Kamijo et al., 1998). Cette association induit l'inhibition de l'activité ligase de groupements d'ubiquitine de type E3 de MDM2 ainsi que le transport nucléo-cytoplasmique de MDM2, qui est séquestré par ARF dans le nucléole via le site de localisation nucléolaire présent dans MDM2 (Figure 26) (Lohrum et al., 2000, Weber et al., 2000). Cette séquestration a pour effet de neutraliser l'effet inhibiteur de MDM2 sur p53 (Honda & Yasuda, 1999, Weber et al., 1999). Ces observations ont mené à la conclusion que ARF protège les cellules normales contre les stimuli oncogéniques, en se comportant comme régulateur positif de p53. ARF peut également favoriser l'acétylation de p53 qui est bloquée par MDM2 (Ito et al., 2001). Il a été également montré que ARF agit sur MDM4 de la même façon que sur MDM2 (Jackson et al., 2001).

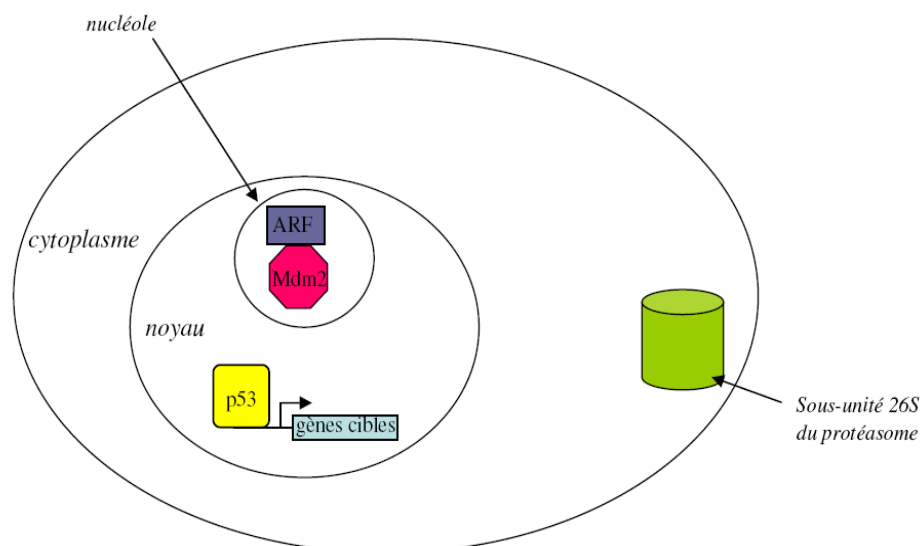


Figure 26 : Représentation schématique de l'action de ARF sur MDM2. ARF séquestre MDM2 dans le nucléole, empêchant ainsi la dégradation de p53.

b. PML (Promeolytic Leukemia protein)

PML : « Promeolytic Leukemia protein » participe à l'acétylation et l'activation transcriptionnelle de p53 (Guo et al., 2000, Pearson et al., 2000). Après des dommages d'ADN, la protéine PML est localisée dans le noyau avec p53 et ses coactivateurs tel que CBP. Ce recrutement conduit à des modifications post-traductionnelles de p53 (acétylation et phosphorylation) et donc à son activation.

c. ASPP (Apoptosis Stimulating Protein of p53)

ASPP1 et ASPP2 peuvent réguler l'activité pro-apoptotique de p53 en se fixant à son domaine central de fixation à l'ADN (Liu et al., 2005, Slee & lu, 2003). Elles induisent l'apoptose en stimulant l'activité transcriptionnelle de p53 et donc l'expression de ses gènes cibles. Cependant, en se fixant à p53, MDM2 et MDM4 peuvent empêcher son activation par ASPP (Bergamaschi et al., 2005). Une autre protéine iASPP a été identifiée comme étant un inhibiteur compétitif de ASPP. Elle peut ainsi bloquer l'induction de l'apoptose par p53 en inhibant l'expression de ses gènes cibles pro-apoptotiques (Bergamaschi et al., 2003).

P53 peut être également activée par une autre voie déclenchée par les oncogènes cellulaires ou viraux. Ces oncogènes tels que c-myc, ras ou bêta-caténine stabilisent p53 en activant la transcription de p14/ARF (Lin & Lowe, 2001, Zindy et al., 1998). L'activation de p53 par des oncogènes représente un mécanisme de protection de la cellule contre la cancérogénèse

IV. Les gènes cibles de P53

L'activation transcriptionnelle des gènes cibles de p53 se fait par liaison de ce dernier sur ses séquences cibles localisées dans le promoteur ou les premiers introns des gènes. La séquence nucléotidique consensus sur laquelle se lie p53 a été identifiée ; elle est composée de deux copies du motif 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GpyPyPy-3' séparées par 0 à 13 paires de bases (El-Deiry et al., 1992, Hainaut et al., 1994, Hupp et al., 1994, Funk et al., 1992). L'identification dans le génome de séquences cibles potentielles par différents algorithmes informatiques (Hoh et al., 2002) ainsi que l'utilisation de techniques permettant la comparaison du profil d'expression de gènes entre des conditions de non induction et d'induction de p53 (criblage différentiel, de biopuces à ADN et SAGE) a permis d'identifier différents gènes cibles de p53

(Nakamura, et al., 2004). Le gène *mck* (murine muscle-specific creatine kinase) a été le premier identifié (Zambetti et al., 1992). Les gènes cibles de p53 codent principalement des protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire, essentiellement médiatrices de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire. Ces gènes peuvent coder pour des protéines mitochondriales : BAX (Myaschita et al., 1994, Myaschita et al., 1995), BID (Sax et al., 2002), NOXA (Oda et al., 2000), PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) (Nakano & Vousden, 2001) et p53AIP (Oda et al., 2000), des effecteurs de la machinerie apoptotique tels que la protéine Apaf-1 (Moroni et al., 2001), Fas, Killer/DR5 (Takimoto et al., 2000, Wu et al., 1997) et PIDD (Lin et al., 2000), des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire : p21 (el Deiry et al., 1993, Harper et al., 1993), 14-3-3 (Hermeking et al., 1997), GADD45 (Growth Arrest and DNA-Damage inductible) (Kastan et al., 1992), cyclin G1 (Okamoto & Beach, 1994, Zauberman et al., 1995) et GTSE1 (Utrera et al., 1998). P53 est également capable de réprimer la transcription de certains gènes tels que MDR1, *c-myc*, IL6, BCL-2 et BCL-X_L (Haldar et al., 1994) (Figure 27). La liste de ces gènes ne cesse de s'allonger (Spurgers et al., 2006). Le mode de répression de la transcription est encore mal connu, par ailleurs, on sait que p53 peut lier le facteur initiateur de la transcription TBP ainsi que le régulateur NF-Y capables d'inhiber la transcription des gènes dépourvus de site de fixation de p53 (Imbriano et al., 2005). NF-Y peut se lier *in vivo* et *in vitro* à p53 et empêcher sa tétramérisation.

Les gènes activés ou inhibés répondent différemment à p53, et la cinétique ainsi que le mode de réponse permettent de les regrouper en grandes classes. On trouve ceux qui sont rapidement activés ou réprimés, en opposition à ceux dont la transcription est modifiée après un certain temps. Certains sont tout d'abord activés puis réprimés (ou inversement), on parle dans ce cas de réponse biphasique (Yomm et al., 2002).

Outre son rôle majeur comme facteur de transcription, p53 possède d'autres fonctions (Caelles et al., 1994, Bissonnette et al., 1997) indépendantes de son activité transcriptionnelle. En effet p53 peut agir par interaction directe avec d'autres protéines d'origine virale ou cellulaire. La liste des partenaires protéiques de p53 ne cesse de s'allonger. La plupart des protéines connues pour agir avec p53 sont représentées dans le tableau suivant en fonction de leur rôle (Figure 27).

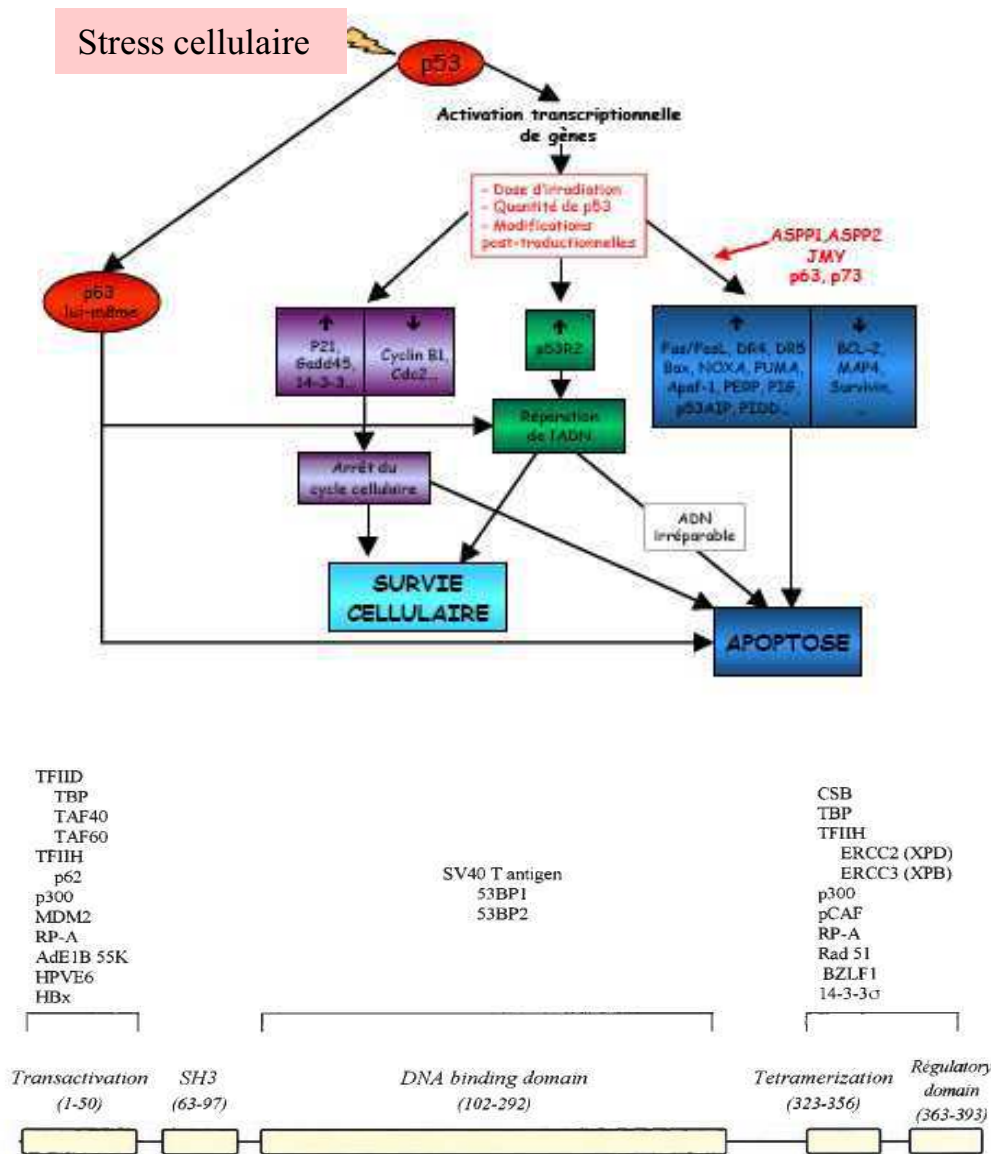


Figure 27 : Représentation schématique des gènes cibles de p53 (A) et de ses partenaires protéiques (D'après (May & May, 1999) (B).

V. Homologues et Isoformes de p53

Les études menées en 1997 et 1998 ont permis la découverte respective des protéines p73 et p63, deux isoformes de p53, révélant ainsi une famille multigénique de facteurs de transcription se caractérisant par une extrême diversité de fonctions biologiques (Yang et al., 2002, Bénard et al., 2003). L'homologie du trio concerne non seulement la séquence, mais aussi l'organisation des domaines d'activité fonctionnelle de facteurs de transcription (transactivation TA, fixation à l'ADN, DBD et oligomérisation, OD), à l'exception néanmoins d'un domaine SAM (*sterile alpha motif*) supplémentaire, caractéristique de p63 et p73 et responsable d'interactions protéine-protéine (Figure 28A). Les deux homologues, p73 et p63, possèdent une combinaison d'isoformes protéiques multiples dues à l'utilisation de deux promoteurs alternatifs (P1 et P2) et à des épissages de l'ARN dans la partie C-terminale des molécules. L'utilisation de P1 ou P2 génère respectivement les isoformes TA et ΔN , aux propriétés opposées. Ainsi, chaque homologue répond au concept du "2 gènes en 1" car exprimant 2 types d'isoformes aux effets biologiques opposés : les uns présentant un domaine de transactivation (TAD), aux propriétés de protéine suppresseur de tumeurs, les autres dépourvues de TAD, les isoformes ΔN , aux propriétés oncogéniques.

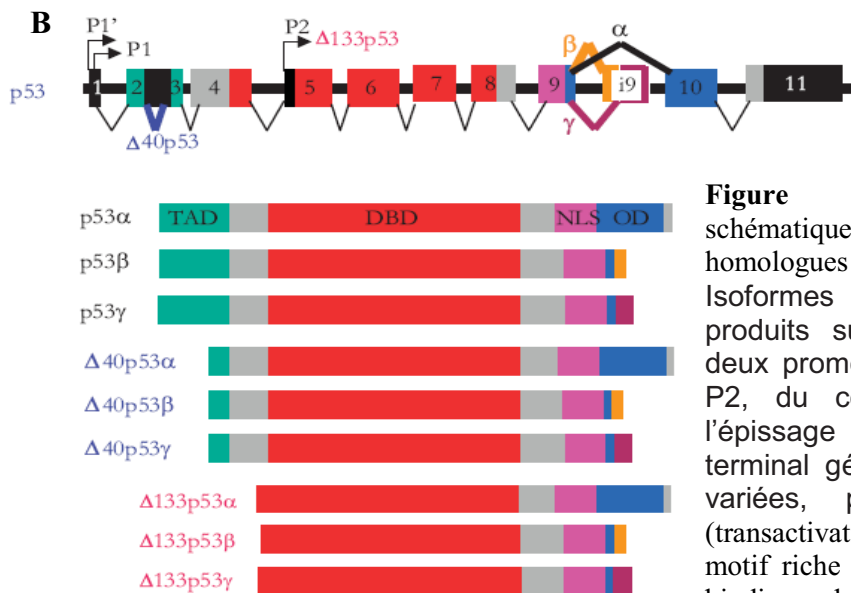
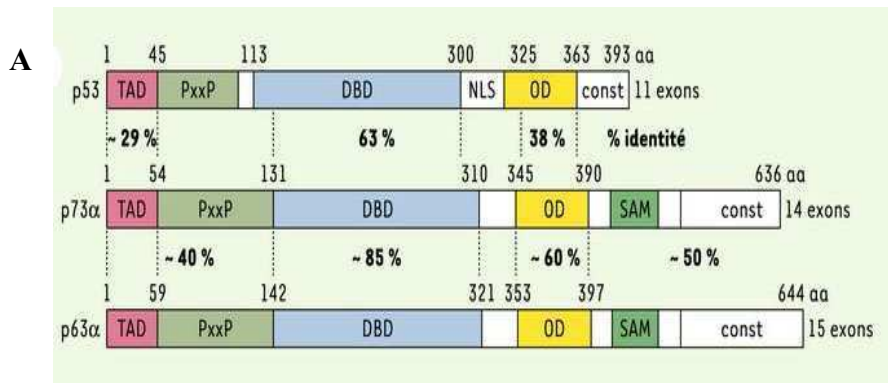


Figure 28 : Représentation schématique de p53 et de ses homologues p63 et p73 (A). Isoformes protéiques potentiels produits suite à l'utilisation de deux promoteurs majeurs, P1 et P2, du côté N-terminal et à l'épissage alternatif du côté C-terminal générant des isoformes variées, p53 α , ou γ (B). TAD (transactivation domain) ; PxxP: motif riche en proline; DBD (DNA binding domain); NLS (nuclear localizing signal) ; OD (oligomerization domain). Le domaine SAM (sterile alpha motif domain).

Comme il a été mentionné précédemment, le gène p53, composé de 11 exons, utilise un promoteur P1 situé en amont de l'exon 1 qui conduit à la forme entière de p53, dotée d'un domaine TA. Jusqu'en 2002, aucun épissage alternatif n'a été démontré chez l'homme contrairement à la souris où l'épissage produit une protéine P53as qui est plus courte de 9 acides aminés que la protéine p53 native et différente au niveau de son extrémité C-terminale. Récemment, l'équipe de Pierre Hainaut a pu établir l'existence d'isoformes $\Delta Np53$ agissant comme un dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle et apoptotique de p53 (Courtois et al., 2002). Une autre étude a montré que le gène p53 exprime, lui aussi, un ensemble d'isoformes en utilisant les mêmes mécanismes que ses homologues p63 et p73 : promoteurs alternatifs en N-ter générant des variantes de protéines dont certaines conservent le domaine TA et d'autres en sont dépourvues ($\Delta Np53$), ainsi qu'un épissage alternatif de la partie C-terminale générant de multiples isoformes (Bourdon et al., 2005). En effet, il a été démontré qu'il existe un second promoteur dans l'intron 4 du gène p53. Ce promoteur P2 génère un transcrit à un seul cadre de lecture codant pour une protéine N-tronquée initiée à partir du codon 133, l'isoforme $\Delta 133p53$, un promoteur conservé d'ailleurs dans l'évolution car retrouvé dans le gène p53 de la drosophile (Figure 28B). L'expression de ces isoformes serait tissu-dépendante. Elles joueraient un rôle dans la régulation de l'activité de p53 selon le contexte cellulaire et tissulaire.

Il existe une boucle de régulation transcriptionnelle $\Delta Np73$, TAp73 et p53. En effet, TAp73 active directement la transcription du $\Delta Np73$ endogène en se fixant aux séquences consensus de P2 ; p53 active elle aussi l'expression de $\Delta Np73$ endogène tant au niveau transcriptionnel que protéique, suite à l'activation directe de ses sites de fixation situés dans le promoteur P2. Une fois induite, $\Delta Np73$ réprime p53 et TAp73. Ceci offre à la cellule un nouveau système d'autorégulation lui permettant de moduler sa survie et sa mort.

VI. Rôles de p53

Suite aux lésions de l'ADN, p53 est activé et conduit soit à un arrêt du cycle cellulaire et/ou une réparation des dommages, soit à l'apoptose. La nature des gènes activés ou réprimés par p53 va déterminer la réponse cellulaire aux dommages d'ADN.

VI.1. La Sénescence

La sénescence est un arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule. La sénescence est causée par le raccourcissement des télomères (sénescence réplivative) ou par l'exposition aiguë ou chronique à d'autres signaux de stress physiologique (un phénomène appelé *stasis, stress or aberrant signaling-induced senescence*). La sénescence réplivative est un processus physiologique dépendant des télomères qui raccourcissent au fur et à mesure des divisions de toute cellule normale et qui conduit à l'arrêt de la prolifération. À partir d'un seuil critique de taille des télomères et en l'absence d'expression de la télomérase hTERT, la sénescence réplivative est initiée par des signaux de dommage de l'ADN qui aboutissent à l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire comme p53, p16INK4a et Rb (protéine du rétinoblastome).

L'entrée en sénescence peut s'accompagner de l'activation de p53 et de l'accumulation de son gène cible p21 (Noda et al., 1994) ce qui provoque l'arrêt du cycle. Divers stimulus peuvent activer un programme commun de sénescence. Le raccourcissement des télomères est le stimulus physiologique le mieux décrit dans l'induction de la sénescence. L'expression d'oncogènes activés peut également déclencher la sénescence et représenterait une autre façon par laquelle la sénescence est un mécanisme suppresseur de tumeur. Le programme effecteur de la sénescence comprend les voies p53/p21 et p16INK4a/Rb. P53 est activé par les kinases ATM/Chk2 (médiateurs des systèmes de réparation des dommages de l'ADN) ou par p19ARF ou p14ARF chez l'humain. p14ARF inhibe MDM2, empêchant ainsi la dégradation de p53 (Weber et al., 1999). Le facteur p16INK4a serait activé par le stress imposé par des conditions inadéquates de culture et par une stimulation oncogénique dérégulée. Les mécanismes responsables de l'accumulation de p16INK4a sont encore méconnus.

VI.2. La réparation de l'ADN

P53 est directement impliqué dans la réparation de l'ADN, par sa capacité d'interagir avec des composants de la machinerie de réparation et de recombinaison (Sengupta et al., 2005). Elle est impliquée dans la réparation par recombinaison homologe, HR et la suture non homologe des extrémités, NHEJ en interagissant avec RAD51 et BRCA1. P53 régule la voie de réparation HR en contrôlant la fidélité de la recombinase Rad51 (Gatz & Wiesmuller, 2006). De plus, certains chercheurs ont mis en évidence une activité exonucléasique exercée par la partie C-terminale de p53 et impliquée dans la réparation de CDB suite à l'irradiation de lignées lymphoblastiques humaines (Mallya & Sikpi, 1998). Mais cette activité exonucléasique est remise en question dans une étude plus récente.

En outre, p53 favorise également la réparation par excision de bases BER, *in vitro* et *in vivo*. La stimulation de ce mode de réparation par p53 est corrélée à son interaction avec l'endonucléase APE1 et avec l'ADN polymérase β constituants du système BER (Zhou et al., 2001).

La protéine p53 est également capable d'induire l'expression de XPC et p48 et de recruter directement les hélicases XPB et XPD (deux sous-unités du facteur de transcription TFIIH) régulant ainsi leur activité enzymatique. P53 peut favoriser le système NER en modulant l'accessibilité de la chromatine (Hwang et al., 1999). Il recrute l'histone acétylase p300 qui va acétyler l'histone 3 ce qui induit une relaxation de la chromatine et permet ainsi une meilleure détection des cassures de l'ADN.

VI.3. L'arrêt du cycle cellulaire

P53 peut induire dans certains types cellulaires un arrêt dans la progression du cycle cellulaire. L'arrêt du cycle en G1 empêche à l'ADN endommagé d'être répliqué et l'arrêt en G2 permet la suspension du cycle avant la ségrégation des chromosomes (Teyssier et al., 1999). Il a été rapporté que p53 est également impliqué dans l'arrêt du cycle en phase S.

VI.3.1. Le point de contrôle G1/S

P53 stoppe le cycle cellulaire en G1 par deux mécanismes distincts. Le premier consiste en l'interaction directe de p53 avec les protéines jouant un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN telles que RPA (replicon protein A), ce qui inhibe l'initiation de la réplication et

provoque l'arrêt du cycle. La régulation de gènes cibles constitue le deuxième mécanisme par lequel p53 induit un arrêt en phase G1, notamment en activant l'expression de son gène cible codant pour la protéine p21 (El Deiry et al., 1994, Carvajal et al., 2005) qui est le principal acteur de ce point de transition. Quand p21 se fixe sur les complexes cycline E/CDK2 et cycline D/CDK4 et bloque leur activité (Yang et al., 1999, Carvajal et al., 2005). Par conséquent, la protéine suppresseur de tumeur Rb n'est pas phosphorylée et reste active et complexée aux facteurs de transcription de la famille E2F, qui dans ces conditions ne peuvent pas activer la phase de synthèse de l'ADN (S) (Figure 29 A). L'ensemble de ces événements provoque un arrêt du cycle permettant l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN.

Une autre voie d'arrêt du cycle en G1 indépendante de p53, a été mise en évidence. Elle implique la phosphorylation et la dégradation de la phosphatase cdc25A (Mailand et al., 2000, Falck et al., 2001). Ceci conduit à la non activation de CDK2 et empêche la protéine cdc45 de se fixer à la chromatine et donc de recruter de l'ADN polymérase alpha. Cette voie indépendante de p53 semble jouer un rôle dans l'arrêt initial du cycle en phase G1/S. Et pour maintenir cet arrêt, l'activité transcriptionnelle de p53 entre en jeu et permet l'expression ses gènes cibles.

VI.3.2. Le point de contrôle G2/M

L'arrêt du cycle cellulaire en G2/M par p53 s'effectue par répression du gène de la kinase cdc2 ou du gène de la cycline B1, le complexe cycline B1-cdc2 étant le régulateur clé du passage de la phase G2 à la phase M (Innocente et al., 1999). P21 induit par p53 pourrait jouer un rôle dans cette répression. En outre, p53 active la transcription de la protéine 14-3-3 qui fixe et séquestre cdc25, une autre protéine kinase chargée d'activer cdc2. Cdc2 alors inactivé ne peut assurer l'entrée de la cellule en mitose. Un autre gène, GADD45, également surexprimé par p53 en réponse à l'irradiation, intervient dans l'arrêt en G2/M, en déstabilisant le complexe cycline B1-cdc2 (Xiao et al., 2000).

Enfin, la protéine 14-3-3, activée également par p53, fixe et séquestre cdc25, la protéine kinase chargée d'activer cdc2 (Taylor & Stark, 2001, Chan et al., 1999). cdc2 alors inactivé ne peut assurer l'entrée de la cellule en mitose (Figure 29 B).

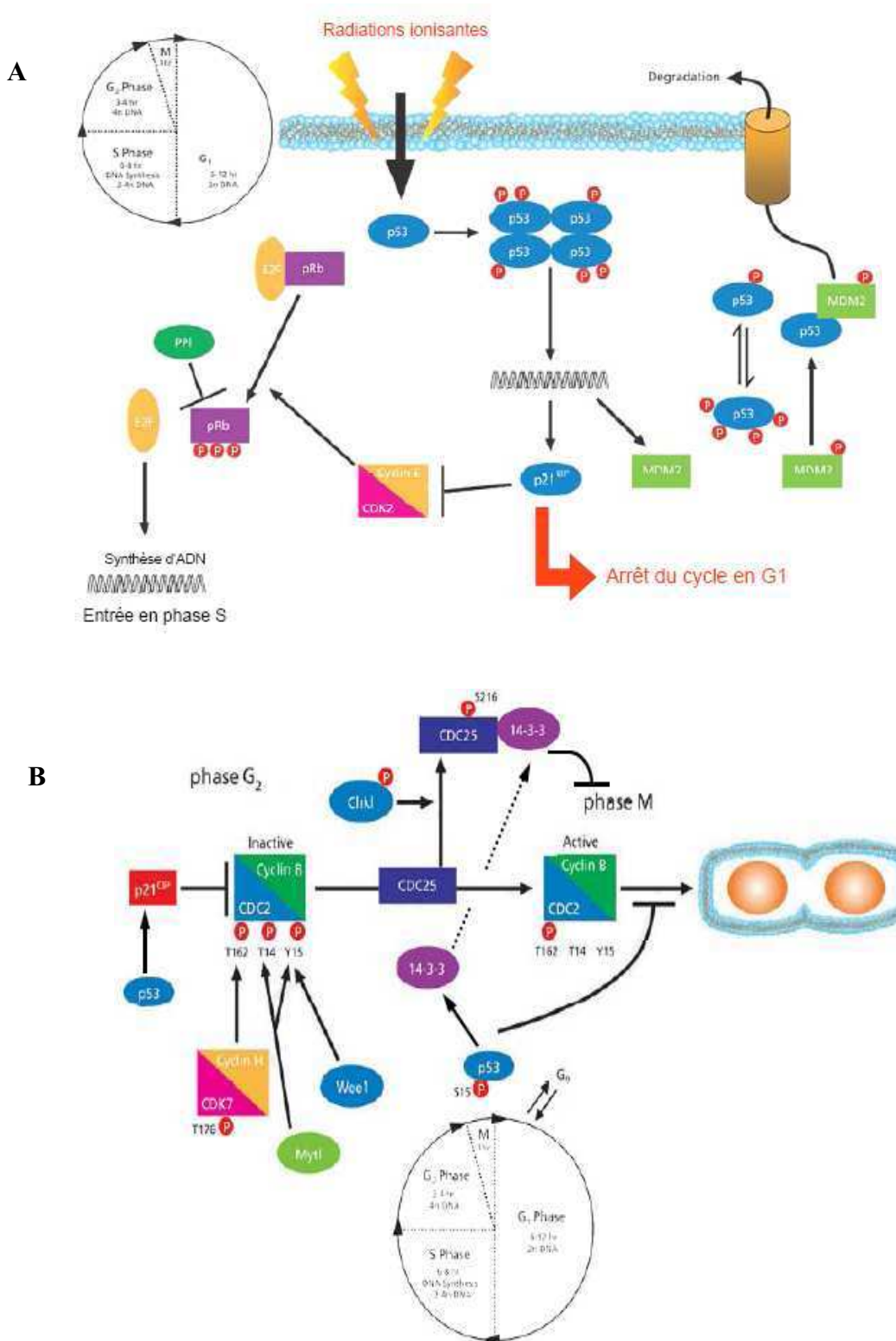


Figure 29 : Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle en G1/S (A) et en G2/M (B).

VI.3.3. Le point de contrôle intra-phase S

Les dommages qui se produisent durant la phase S sont à l'origine de l'inhibition de la réplication et de la synthèse de l'ADN. C'est le cas du stress induit par la Fludarabine*. Il a été rapporté que p53 est également impliqué dans l'arrêt du cycle en phase S mais son rôle reste à préciser.

VI.4. L'apoptose induite par p53

La fonction de facteur de transcription de p53 est essentielle pour son rôle pro-apoptotique et anti-tumoral. Des mutations dans le domaine de transactivation entraînent une réduction de la réponse apoptotique chez des cellules ES ou des thymocytes suite à des dommages de l'ADN (Chao et al., 2000). Par ailleurs, il a été mis en évidence, grâce à des mutants p53, que la région riche en proline est nécessaire pour l'induction de l'apoptose. En effet, les mutants qui présentent une délétion de cette région, ont une expression de gènes pro-apoptotiques mais sont incapables de réprimer les gènes cibles de p53 et ainsi d'induire l'apoptose. La répression de gènes au même titre que l'induction de gènes, joue un rôle important pour l'apoptose induite par p53 (Venot et al., 1998).

La protéine p53 peut activer des gènes dont les produits sont localisés dans le cytoplasme comme PIDD (Lin et al., 2000) qui déclencherait l'apoptose par activation de la caspase-2 (Tinel & Tschopp, 2004). Les gènes PIG (p53 Inducing Genes) et le gène de la ferredoxin-reductase sont également activés par p53 (Venot et al., 1998, Hwang et al., 2001). La protéine PIG3 entraîne la production de ROS, qui causent des dommages mitochondriaux et la ferredoxin réductase sensibilise les cellules aux radicaux oxygénés ce qui induit l'apoptose (Polyak et al., 1997).

D'autres gènes, dont l'expression est activée par p53, codent pour des protéines qui interagissent avec la mitochondrie, comme p53AIP (Matsuda et al., 2002) ou pour les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 : BAX, BOK (Yakovlev et al., 2004), PUMA (Nakano & Vousden, 2001) et NOXA (Oda et al., 2000, Villunger et al., 2003). P53AIP induit la chute du potentiel membranaire mitochondrial et favorise ainsi le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. La protéine BAX va également permettre la libération du cytochrome c, après interaction avec la membrane mitochondriale, ce qui conduit à l'activation des caspases (Schuler et al., 2000). De plus, simultanément à

l'expression de BAX, p53 induit en général une sous-expression de BCL-2, ce qui empêche la neutralisation de BAX par ce dernier (Miyashita et al., 1994). PUMA, suite à son activation par p53, se localise également au niveau de la mitochondrie, neutralise BCL-2 et induit le changement conformationnel de BAX (Nakano & Vousden, 2001, Liu et al., 2003). NOXA induit aussi un dysfonctionnement mitochondrial en activant le pore de transition de perméabilité (Seo et al., 2003). Des cellules intestinales de souris déficientes en NOXA présentent une résistance à l'apoptose induite par les rayons X (Shibue et al., 2003). En outre, p53 surexprime le gène d'Apaf-1, qui s'associe au cytochrome libéré de la mitochondrie, et forme l'apoptosome (Robles et al., 2001).

La localisation de p53 dans la mitochondrie est au niveau de la membrane externe mitochondriale et précède son accumulation dans le noyau (Sansome et al., 2001). L'action de p53 au niveau de la mitochondrie pourrait augmenter son action au niveau du noyau et donc amplifier son activité pro-apoptotique. Plusieurs études (Polyak et al., 1997). Marchenko et ses collaborateurs ont décrit que p53 était localisé dans la mitochondrie après une hypoxie ou l'induction de lésions sur l'ADN (Marchenko et al., 2000). Cette localisation mitochondriale ne se produit pas lors d'une apoptose indépendante de p53 ou lors d'un arrêt du cycle cellulaire. Le transfert de p53 dans la mitochondrie est rapide et précède le relargage du cytochrome c et l'activation de la procaspase-3. De plus, Mihara et ses collaborateurs ont montré que p53 pouvait induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe en formant un complexe avec les protéines anti-apoptiques BCL-2 et BCL-X_L (Mihara et al., 2003). L'interaction de p53 à BCL-X_L se fait par le domaine de liaison à l'ADN. Par ailleurs, p53 provoque aussi l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique par augmentation de l'expression de la scotin, protéine de la membrane du réticulum (Bourdon et al., 2002). En plus de BCL-2 (Haldar et al., 1994), p53 régule négativement l'expression d'autres gènes anti-apoptotiques, notamment MAP4, protéine associée aux microtubules (Murphy et al., 1996) ou la survivin, qui est un inhibiteur de caspases de la famille IAP (Hoffman et al., 2002). L'implication de p53 dans l'apoptose peut être indépendante de son activité transcriptionnelle (Haupt et al., 1995), en effet, dans certains cas, l'activité transcriptionnelle de p53 n'est pas requise pour induire la mort cellulaire (Marchenko et al., 2000) et est permise par son interaction avec d'autres protéines agissant au niveau de la réparation de l'ADN, comme TFIIH (Wang et al., 1996). De plus, il a été démontré récemment que suite aux dommages de l'ADN, p53 peut se localiser directement dans la mitochondrie et interagir avec BCL-2 et BCL-X_L (Erster et al., 2004). P53 aurait aussi un rôle direct au niveau de la

mitochondrie (Marchenko et al., 2000) où elle pourrait réguler la transcription de gènes par liaison directe avec l'extrémité 5' non transcrite des ARNm (Miller et al., 2000).

Parmi les gènes induits par p53, certains codent pour des protéines situées dans la membrane plasmique, comme le récepteur Fas et/ou son ligand FasL, les récepteurs de TRAIL : DR5 (Takimoto & el-Deiry, 2000) et DR4 (Guan et al., 2001) ou la protéine membranaire PERP (Ihrle et al., 2003). Les récepteurs membranaires Fas, DR4 et DR5 appartiennent aux récepteurs de mort et activés par leur ligand, ils vont conduire à l'apoptose par l'intermédiaire de la caspase-8. Par ailleurs, p53 peut favoriser la voie de Fas, par un mécanisme indépendant de son activité de facteur de transcription, en améliorant le transport de la protéine Fas des réserves intracellulaires jusqu'à la surface de la cellule (Bennett et al., 1998).

VI.4.1. Quels sont les mécanismes par lesquels p53 induit l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire ?

En réponse au stress, p53 induit sélectivement des gènes régulateurs du cycle cellulaire ou des gènes activant l'apoptose. Plusieurs paramètres semblent influencer le choix des gènes régulés par p53. Deux modèles explicatifs sont proposés : (Figure 30)

Le modèle DUMB : propose que p53 induit tous ses gènes cibles ; une apoptose serait donc induite. Mais selon le contexte (la présence de survie, de facteurs de croissance, voire l'action d'autres facteurs de transcription) la cellule pourrait simplement s'arrêter de proliférer.

Le modèle smart : propose plutôt que p53 participe directement au choix du type de réponse cellulaire à engager ; p53 induit donc sélectivement ses gènes cibles. Il induirait par exemple l'expression sélective de gènes pro-apoptotiques lorsque les conditions nécessitent l'élimination de la cellule endommagée.

Les nombreuses données obtenues jusqu'à présent n'ont pas permis de trancher définitivement entre les deux modèles. De nombreuses observations étayent le modèle "DUMB". Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées sur des cellules exprimant la protéine p53 sauvage et soumises à un stress génotoxique, ont par exemple permis de montrer que p53 n'est pas recruté spécifiquement au niveau des promoteurs des gènes proapoptotiques (Kaeser & Iggo, 2002).

La réponse de la cellule suite à l'activation de p53 semble aussi dépendre de différents facteurs. Les principaux sont :

- le contexte cellulaire: certaines protéines comme le facteur de transcription NF- κ B contribuent à l'induction de l'apoptose suite à l'activation de p53, mais pas à l'arrêt du cycle cellulaire (Ryan et al., 2000). Un autre exemple est donné par le fait que p53, suite à l'action de la doxorubicine, induit l'apoptose ou l'arrêt de la croissance de MEF selon l'expression ou non de la protéine oncogénique E1A (Lowe & Ruley, 1993, Lowe et al., 1993, Lowe et al., 1994),
- la présence de facteurs de croissance: p53 induit l'apoptose ou l'arrêt de la croissance de MEF selon la privation en sérum ou pas (Lowe & Ruley, 1993, Lowe et al., 1993, Lowe et al., 1994, Soengas et al., 1999),
- la nature du stress génotoxique: des rayons γ induisent via p53 un arrêt du cycle cellulaire des MEF tandis qu'un traitement aux rayons UV-C induit via p53 l'apoptose de ces cellules (Attardi et al., 2004),
- la quantité d'agent génotoxique (Komarova et al., 2004)

Le modèle "DUMB" est en accord avec un modèle récemment proposé, le "death threshold" (limite au-delà de laquelle la cellule est éliminée par apoptose), selon lequel l'apoptose n'a lieu que quand l'ensemble des facteurs proapoptotiques de la cellule est plus important que l'ensemble des facteurs antiapoptotiques. En conséquence ce modèle prévoit l'impossibilité d'attribuer à un seul facteur l'entrée en apoptose de la cellule (Lowe et al., 2004).

Les observations étayant plutôt le modèle "SMART", reposent sur le fait que le taux de p53 actif dans la cellule ainsi que l'affinité avec laquelle il lie sa séquence cible seraient capitaux: En effet, Chen *et al.* ont démontré que lorsque la quantité de p53 est faiblement augmentée, l'arrêt du cycle cellulaire est induit, alors qu'une forte augmentation de p53 entraîne la mort de la cellule. L'affinité pour les promoteurs des gènes serait responsable de cette différence : la concentration élevée de p53 permet l'interaction avec les promoteurs de faible affinité comme les gènes pro-apoptotiques alors que la liaison aux promoteurs de gènes de régulation du cycle cellulaire est plus spécifique et n'a lieu que lorsque p53 est présent en faible quantité. L'apoptose n'aurait alors lieu que lorsque le taux de p53 actif serait élevé. En accord avec ce dernier modèle il a été montré que l'expression d'un certain nombre de gènes cibles est modifiée en fonction de la quantité intracellulaire de p53 (Chen et al., 1996, Yoon et al., 2002), et que p53 ne lie pas ses séquences cibles avec la même affinité (Szak et al., 2001). Ces différences d'affinité peuvent dépendre d'un certain nombre de facteurs comme la nature de la séquence cible (Qian et al., 2002), la conformation de p53 (Thornborrow & Manfredi, 1999) et des modifications post-traductionnelles de p53. Par exemple la phosphorylation du résidu ser46 de p53 induit spécifiquement l'apoptose via l'induction du gène codant la

protéine p53AIP1 (Oda et al., 2000, Okamura et al., 2001, Mayo et al., 2005). Par ailleurs certaines mutations ponctuelles (des substitutions) affectant p53 dans la séquence codant son domaine de liaison à l'ADN peuvent lui conférer une incapacité à induire l'apoptose mais pas l'arrêt du cycle cellulaire (Friedlander et al., 1996, Ludwig et al., 1996, Liu et al., 2004).

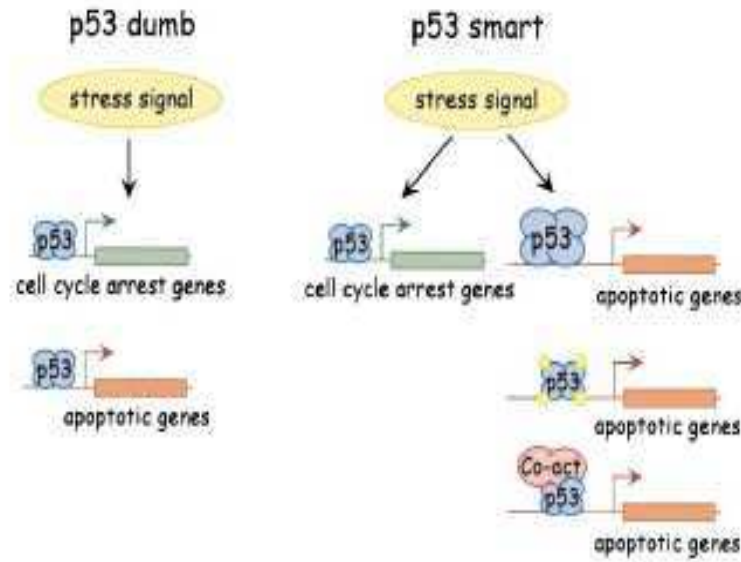


Figure 30 : Représentation schématique des deux modèles expliquant les mécanismes par lesquels p53 induit l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire : - le modèle "DUMB" : p53 induit tout ses gènes cibles et il en résulte une induction de l'apoptose, mais selon le contexte cellulaire il peut également en résulter un arrêt du cycle cellulaire - le modèle "SMART" : p53 induit sélectivement ses gènes cibles ; il lie avec une forte affinité les séquences cibles localisées dans les gènes codant des médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire et avec une faible affinité les séquences cibles localisées dans des gènes pro-apoptotiques. L'apoptose serait induite suite à l'augmentation du taux intracellulaire de p53 plus élevé, à des modifications de la capacité de liaison de p53 aux séquences cibles (nature de la séquence cible, modifications posttraductionnelles et conformationnelles de p53) et enfin à l'action de coactivateur (D'après (Vousden et al., 2000)).

L'affinité de l'interaction de p53 avec un promoteur donné dépend aussi des interactions avec d'autres protéines cellulaires ou virales. Ainsi, il existe d'une part des régulateurs généraux de p53 (MDM2, E2F1, p300/CBP), qui régulent l'activité de transactivation de tous les gènes cibles et d'autre part des protéines qui régulent spécifiquement la capacité de p53 à induire l'apoptose (ASPP1, ASPP2, p73) (Slee et al., 2004). Les protéines ASSP, identifiées comme protéines coactivatrices de p53, semblent favoriser la liaison de p53 spécifiquement sur le promoteur des gènes pro-apoptotiques *in vivo*, ainsi que leur induction (Samuels-Lev et al.,

2001). Comme BAX et PIG3 alors qu'elle a peu d'effet sur les gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Bergamaschi et al., 2004, Samuels-Lev et al., 2001). De même, JMY (junction-mediating and regulatory protein), cofacteur de p300, régule la fonction apoptotique de p53 en augmentant l'activation de BAX par p53 (Shikama et al., 1999), sans induire pour autant l'expression de p21, régulateur du cycle cellulaire : JMY favorise l'apoptose et non l'arrêt du cycle.

Donc, la quantité de protéine p53, ses modifications ainsi que son interaction avec d'autres protéines oriente la réponse cellulaire en réponse à un stress cytotoxique.

VII. La tyrosine kinase c-Abl

VII.1. La structure de c-Abl

Le gène *abl* code une protéine tyrosine kinase de 145 kDa, sans fonction de récepteur. C-Abl est un proto-oncogène de 140 kDa à activité tyrosine kinase appartenant à la famille des src kinases. A l'origine c-Abl fut identifiée comme étant l'homologue cellulaire de l'oncogène v-Abl du virus abelson. C-Abl est ubiquitaire mais avec une localisation subcellulaire différente contrôlée par les séquences NLS et NES. Cette distribution cellulaire fait que la protéine c-Abl est impliquée dans plusieurs voies de transduction et se voit ainsi attribuer plusieurs fonctions . Il existe 2 isoformes de c-Abl (1a/1b chez l'humain et I/IV chez la souris) qui diffèrent par leur partie N-terminale, en effet l'isoforme 1b contient le site de Myristoylation (modification post-traductionnelle qui joue un rôle très important dans la stabilisation de la conformation auto-inhibitrice de c-Abl) (Levav-Cohen et al., 2006). La région N-terminale de la protéine présente une structure proche de la protéine Src, comporte un domaine d'interaction SH2, un domaine d'interaction SH3, ainsi que le domaine catalytique SH1 qui présente l'activité tyrosine kinase. La région C-terminale présente un domaine de liaison à l'ADN, trois signaux de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Signal) et un site de liaison à l'actine. Cette région est caractérisée par une longue extrémité C-terminale dont le rôle est cruciale pour l'activité de la protéine. Cette région contient : 3 motifs PxxP qui permettent les interactions avec les domaines SH3 des protéines, 3 NLS, 1 NES et un domaines de fixation à l'ADN (Figure 31).

Structurellement, la protéine p210 BCR-Abl , protéine chimérique ou oncogénique résultant de la translocation t(9,22) BCR-Abl, contient la plupart des domaines fonctionnels de c-Abl, à l'exemple des domaines SH2 et SH3, du domaine tyrosine kinase, du domaine de fixation à

l'ADN et du domaine de liaison à l'actine (Figure 31). Le BCR apporteur du domaine de tétramérisation, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion, permet une activation constitutive de la fonction tyrosine kinase de c-Abl et la localisation majoritairement cytoplasmique de la protéine BCR-Abl. L'activité tyrosine kinase de BCR-Abl est directement corrélée à son activité transformatrice et interfère avec les voies RAS et PI-3 kinase ainsi qu'avec les fonctions des protéines d'adhésion.

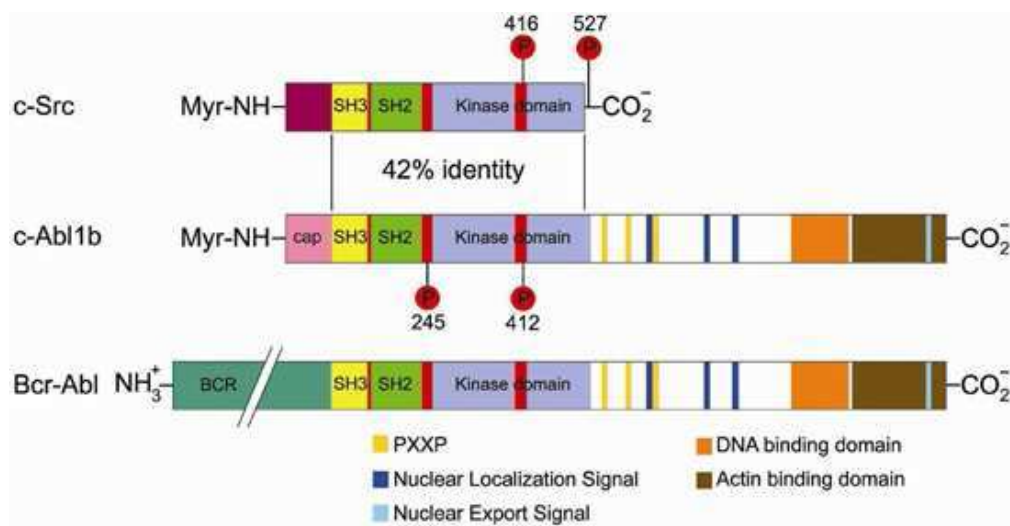


Figure 31 : Représentation schématique de Src, c-Abl et BCR-Abl (D'après (Hantschel & Superti-Furga., 2004)).

VII.2. Mécanismes de la régulation de l'activité de c-Abl

Dans son état « normal », Abl adopte une conformation « fermée » inactive. Cet état inactif, autoinhibé, est la résultante d'interactions entre les domaines de la protéine. Cet état inactif, peut être changé, en un état actif, par l'intervention d'autres protéines, dont d'autres kinases, qui s'associent à c-Abl, modifiant ainsi sa conformation, de sorte que son substrat et l'ATP puissent avoir un accès au site de phosphorylation. L'autoinhibition de c-Abl est tout d'abord assurée par l'action d'un groupe myristoyl qui est rattaché au domaine SH3. Ce myristate trouve également un point d'ancrage réversible, au niveau d'une poche hydrophobe du lobe C du domaine kinase (Figure 32), formant ainsi un loquet. Ceci induit la fermeture de la kinase et la formation d'un « clamp » entre les domaines SH et les deux lobes du domaine kinase. Le clamp ainsi créé, prévient la phosphorylation du segment d'activation, et ce, en le séquestrant, de sorte que la tyrosine 412 de ce segment ne soit pas accessible aux kinases ; ce segment d'activation, lorsqu'il est non phosphorylé sur Y412, empêche l'accrochage du substrat de

Abl et de l'ATP au niveau du domaine catalytique. D'autres interactions intra-protéiques viennent stabiliser cette conformation fermée. En effet, le domaine SH3 interagit par la région proline-like PXXP (où X peut être n'importe quel résidu) avec le SH2-kinase linker, qui adopte une conformation spatiale de type PXXP (sous forme d'hélice polyproline de type II) mais où en fait la dernière proline est remplacée par une tyrosine (motif PXXY) (Figure 32).

L'activation de la kinase se fait en plusieurs étapes. La première, consiste à déverrouiller le groupe myristoyl du lobe C afin de libérer les domaines SH du domaine kinase. La seconde implique la phosphorylation de la tyrosine 245, contenue dans le motif PXXY. Une fois phosphorylée, la région proline-like du domaine SH3 ne reconnaît plus le motif PXXY et ainsi, s'en détache. Ceci laisse la place pour un (ou plusieurs) ligand contenant d'une part une région riche en proline, et d'autre part une tyrosine phosphorylée (il a par ailleurs été montré qu'un ligand avec un motif pTyr-Glu-Asn-Pro possédait une forte affinité pour les deux domaines SH), qui se fixeront respectivement au domaine SH2 et SH3, permettant ainsi l'ouverture de la kinase. Cette ouverture aura pour effet l'exposition vers l'extérieur du segment d'activation, conduisant alors à la possible phosphorylation de Y412, nécessaire à la fixation de l'ATP et du substrat de c-Abl, qui pourra ainsi être phosphorylé (Figure 32 B).

Des expériences de délétions ou de mutations du domaine SH3 résultent en une activation systématique de c-Abl, suggérant le rôle de ce domaine dans l'inhibition de l'activité kinase de la protéine (probablement via des interactions avec des protéines inhibitrices). En effet, il existe des protéines capables de réguler l'activité kinase de c-Abl en interagissant avec le domaine SH3. Citons par exemple les inhibiteurs Abi-1, Abi-2 (Shi et al., 1995, Dai et al., 1995) et l'activateur RFX1 (Agami et al., 1998). L'inhibition de c-Abl n'est pas exclusive au domaine SH3, il existe des protéines qui agissent directement et indépendamment de SH3 tels que Rb (Welch et al., 1993) et pag/MSP23 (Wen et al., 1997) probablement par interaction avec le domaine kinase.

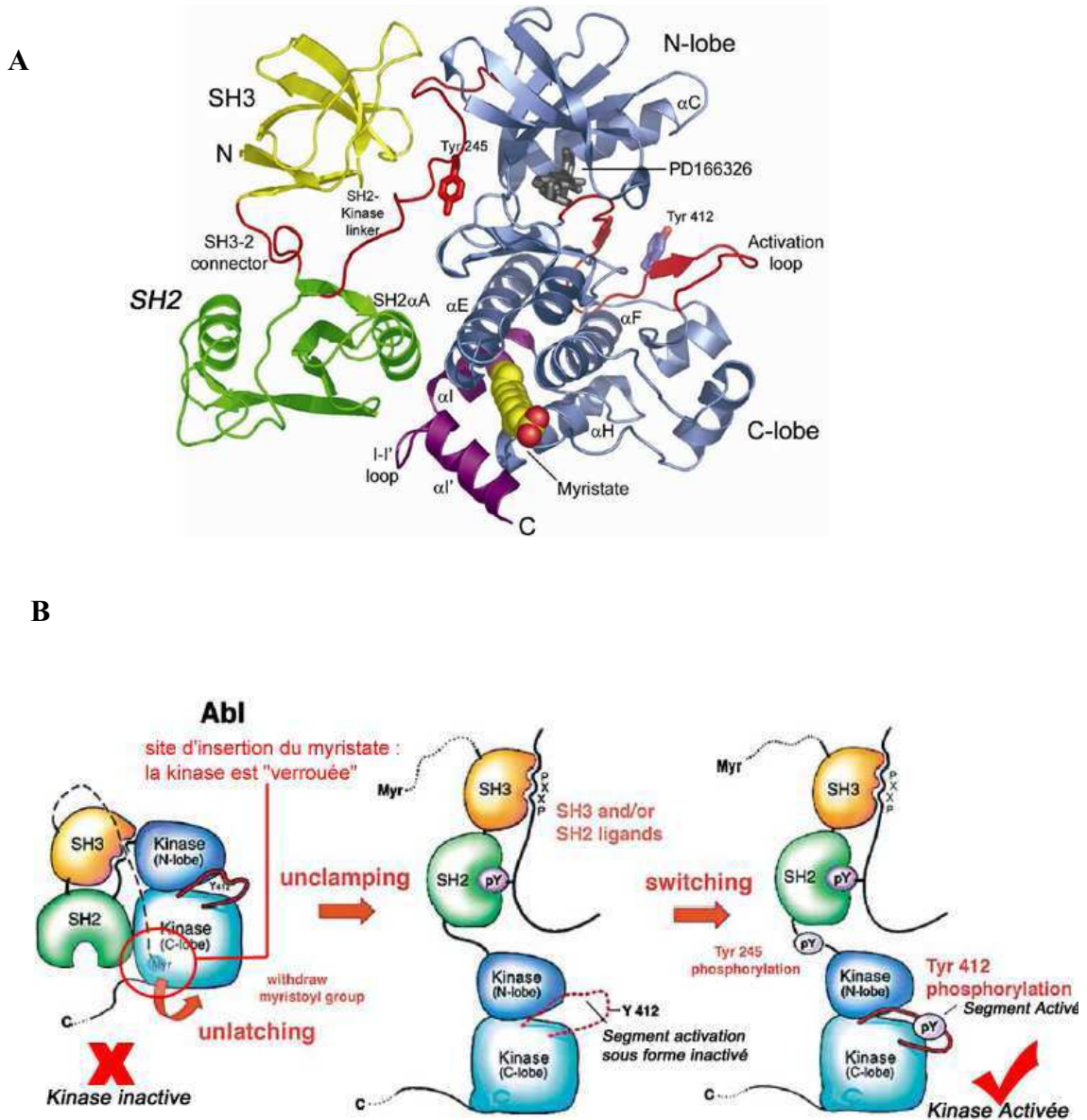


Figure 32 : (A) Structure tridimensionnelle de la protéine c-Abl. Elle est constituée de deux domaines Src-homology SH2 et SH3 ainsi que deux lobes constituant le domaine kinase, un petit lobe N et un plus gros lobe C ; la partie N terminale de la protéine définit un Cap, permettant une interaction avec un groupe myristoyl (ou un groupe palmitoyl) ; un linker entre le domaine SH2 et le lobe N du domaine kinase et les SH2-kinase linker (D'après (Hantschel et al., 2004)). (B) Activation de c-Abl.

VII.3. L'activation de c-Abl

En réponse à un stress génotoxique (sauf les rayons UV), c-Abl est phosphorylée par ATM au niveau de sa sérine 465 ce qui conduit à son activation. De même que les cellules déficientes en ATM chez qui les radiations ionisantes n'activent pas c-Abl, les cellules déficientes en c-Abl sont incapables d'arrêter leur cycle cellulaire en phase G1 après irradiation (Baskaran et al., 1997). Il a été montré que c-Abl interagit avec les acides aminés 1373 à 1382 d'ATM (Shafman et al., 1997) via son domaine SH3. ATM peut également phosphoryler c-Abl indirectement par l'intermédiaire de la sérine kinase DNA-PK.

La protéine c-Abl, localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau, est sujette à un trafic cyto-nucléaire (Taagepera et al., 1998) et donc peut jouer le rôle du messenger en transmettant le stress du noyau vers le cytoplasme et inversement. La localisation nucléaire de c-Abl est primordiale pour son activité pro-apoptotique (Kharbanda et al., 1995, Liu et al., 1996). Dans le cytoplasme, c-Abl interagit avec le cytosquelette (McWhirter et al., 1993, McWhirter et al., 1991, Van etten et al., 1994) et régule la dynamique de la F-Actine en réponse aux signaux extracellulaires (Woodring et al., 2002, Plattner et al., 1999). L'équipe de Yoshida a trouvé que 14-3-3 interagit constitutivement avec c-Abl dans le cytoplasme, ce qui interfère avec son signal de localisation nucléaire NLS et permet sa séquestration dans le cytoplasme. Cette liaison dépend de la phosphorylation constitutive du résidu Thréonine 735 de c-Abl indépendamment de son activité kinase (Yoshida et al., 2005). Après un stress, JNK est activé et phosphoryle la sérine 184 de 14-3-3, ce qui provoque la dissociation du complexe c-Abl/14-3-3 et la translocation de c-Abl dans le noyau. Dans le noyau, c-Abl interagit avec ATM, BRCA1. Lors d'un stress génotoxique, ATM activé provoque la phosphorylation de c-Abl et la dissociation du complexe BRCA1/c-Abl (Baskaran et al., 1997) (Figure 33).

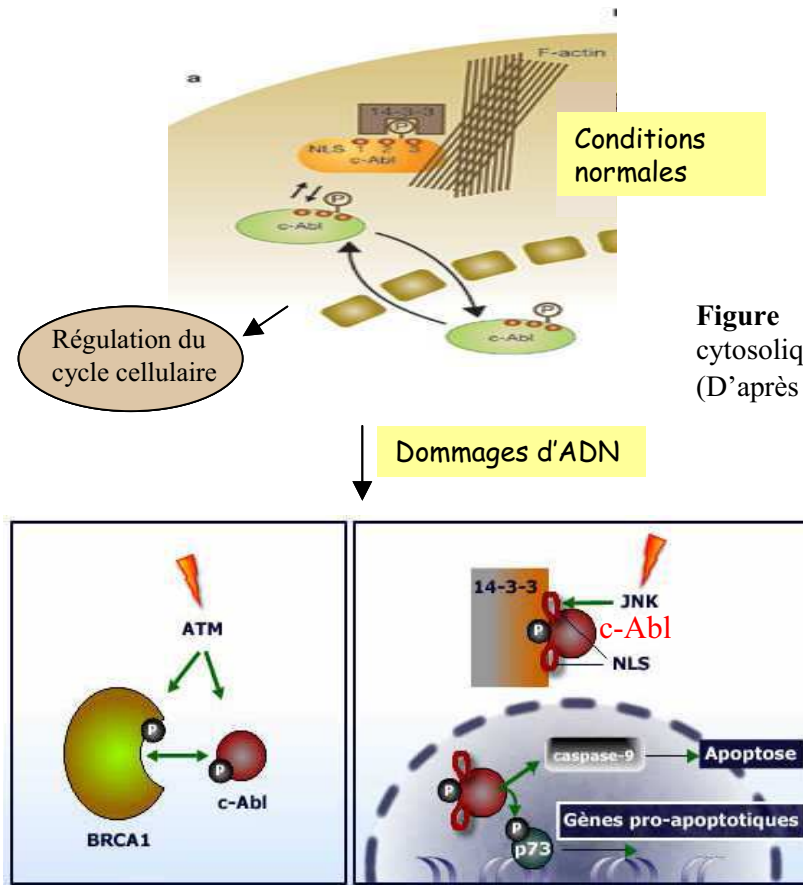


Figure 33 : Activation du pool cytosolique et nucléaire de c-Abl (D'après ((Pendergast et al., 2005)).

c-Abl joue également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire par son interaction avec la protéine Rb (Retinoblastoma 1) (Welch et al., 1993). L'activation de c-Abl est observée dans les cellules proliférantes en phase S uniquement (Liu et al., 1996). En effet, le traitement de cellules, dont la prolifération est synchronisée, par des agents cytotoxiques, active c-Abl uniquement dans les cellules en G1/S (Liu et al., 1996). Dans les cellules en G0/G1, l'activité de c-Abl dans le noyau est réprimée par la protéine Rb dans son état non phosphorylé (Welch & Wang, 1993, Welch & Wang, 1995). Lors du passage des cellules à la phase S, Rb est phosphorylée par le complexe cycline D/CDK4/6, ce qui déstabilise le complexe Rb-c-Abl et permet la libération de c-Abl dans le noyau. La protéine Rb est également impliqué dans l'apoptose induite par les dommages d'ADN. Elle est phosphorylée et dégradée par les caspases lors d'un stress génotoxique ou traitement par le $TNF\alpha$ (Dan et al., 1999).

Enfin, il a été récemment décrit qu'une action directe de c-Abl peut phosphoryler la caspase 9 (initiatrice de la voie intrinsèque de l'apoptose) induisant ainsi son activation par auto-clivage. (Figure 33) (Raina et al., 2005)

VII.4. Rôles de c-Abl

La protéine c-Abl est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose en réponse au stress génotoxique et la transmission de l'information passant par les intégrines. A l'opposé la protéine de fusion BCR-ABL ainsi que la protéine virale v-Abl, interfèrent avec des processus cellulaires normaux comme la prolifération, l'adhérence et l'apoptose en activant des voies de transduction du signal de façon autonome. La protéine contient un domaine de fixation à l'ADN capable d'interagir avec les structures déformées de l'ADN suggérant ainsi l'implication de c-Abl dans la réparation et la recombinaison de l'ADN (David-Cordonnier et al., 1998).

Le rôle de c-Abl dans l'induction de l'apoptose est bien documenté. Il peut interagir avec diverses protéines notamment le facteur de transcription p53 et son homologue p73 (Figure 35). Cependant, p53 n'est pas le facteur clé de la réponse de c-Abl aux dommages d'ADN. En effet, c-Abl peut induire l'apoptose via l'homologue de p53, la protéine p73 dans les cellules p53 null ou dans les cellules p53 positives exprimant la protéine virale E6 capable de dégrader p53 (Yuan et al., 1997). Récemment il a été montré qu'en absence de P53, P73 et FAS, c-Abl induit l'apoptose via la voie mitochondriale, par dépolarisation de la membrane mitochondriale et clivage des caspases 2 et 9 (Lasfer et al., 2006). Globalement, l'action de c-Abl favorise l'apoptose par son action sur p53 et p73, tout en inhibant les voies de réparation.

VII.4.1. C-Abl et p53

Comme dit ci-dessus, il est clairement démontré que c-Abl et p53 interagissent physiquement *in vivo* et *in vitro*. Cette interaction augmente en réponse à un stress génotoxique comme le traitement par l'Aracitine (Yuang et al., 96). C-Abl jouerait un rôle dans la stabilité et l'activité transcriptionnelle de p53 soit par une interaction directe avec p53 soit indirectement par inhibition de son inhibiteur MDM2 due à la phosphorylation du résidu tyrosine 394 (Sionov et al., 1999). Il a été montré que c-Abl stimule l'activité transcriptionnelle de p53 indépendamment de son activité tyrosine kinase (Nie et al., 2000). L'interaction entre c-Abl et p53 fait intervenir le domaine C-terminal de c-Abl et le domaine de tétramérisation (323-356) de p53 ainsi que son domaine auto-régulateur C-terminal (363-393) (Nie et al., 2000). Celui-ci est un domaine d'auto-inhibition et pourrait jouer un rôle dans la fixation de p53 sur l'ADN. Ainsi, en interagissant avec p53, c-Abl stabilise le tétramère p53, favorise sa liaison

avec l'ADN et empêche la dissociation du complexe p53/ADN (Nie et al., 2000, Wei et al., 2005). Gang Wei et ses collaborateurs ont confirmé ces données et ont proposé un modèle d'activation de p53 par c-Abl selon lequel, le tétramère p53 forme un complexe stable avec l'ADN uniquement en présence de c-Abl (Figure 34). De plus, c-Abl masque les sites d'ubiquitination (résidus Lysine 370 et 386) protégeant ainsi p53 de la dégradation (Sionov et al., 2001).

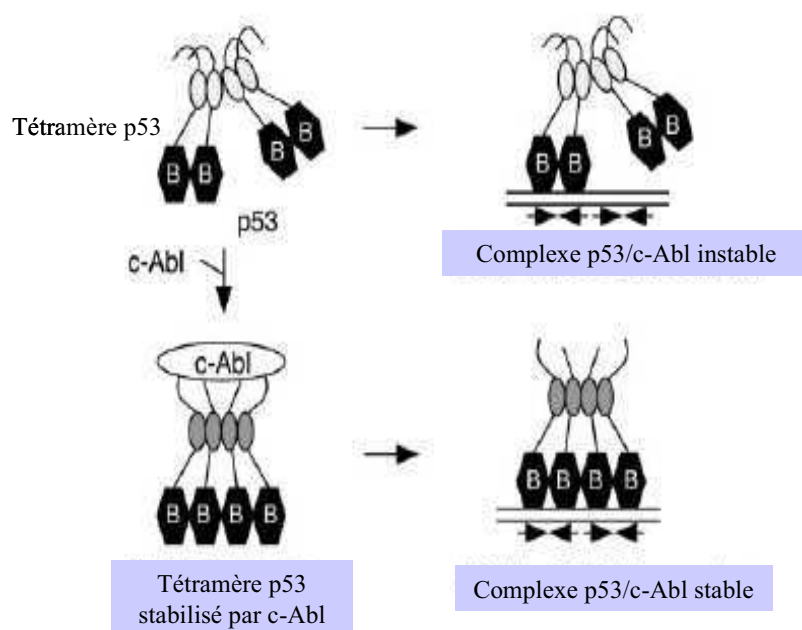


Figure 34 : Modèle de régulation de l'activité transcriptionnelle de p53 par c-Abl (d'après(Wei et al., 2005)).

C-Abl favorise la liaison de p53 sur le promoteur de p21 (Wei et al., 2005). Il existerait une activation sélective de gènes cibles de p53 tel que le gène p21 mais pas BAX régulant ainsi la voie de p53 vers l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Wei et al., 2005). Ceci a été confirmé par une étude récente réalisée sur la lignée cellulaire U2OS qui a montré que c-Abl augmente la capacité de p53 à se fixer sur le promoteur de p21 et ceci d'une manière dépendante de l'interaction entre p53 et c-Abl (Jing et al., 2007).

VII.4.2. C-Abl et p73

Plusieurs études ont permis d'établir que la protéine p73 est activée par l'agent anticancéreux le Cisplatine (Yoshida et al., 2007, Ben-yehoyada et al., 2003). En effet, il a été démontré que suite à l'apparition des lésions d'ADN, la tyrosine kinase c-Abl phosphorylée par ATM induit l'activation de p73 (Yuan et al., 1999), ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire ou une induction d'apoptose, selon les gènes transactivés par p73 (Hamer et al., 2001, Agami et al., 1999, Costanzo et al., 2002), et ceci dans une voie p53-indépendante. C-Abl peut interagir avec le motif PxxP de p73 via son domaine SH3, ce qui provoque la stabilisation de p73 et la phosphorylation de sa tyrosine 99 (Agami et al., 1999, Yuan et al., 1999). Son activation se traduit par l'induction de l'expression de gènes cibles pro-apoptotiques qu'elle a en commun avec p53. Ainsi, Melino et ses collaborateurs ont montré que p73 induit l'apoptose en surexprimant BAX et PUMA (Melino et al. 2004). P73 peut être acétylé par l'acétyltransférase p300/CBP après un stress cellulaire. Cette modification post-traductionnelle joue un rôle très important dans la fonction pro-apoptotique de p73. En effet, l'inhibition de l'acétylation de p73 dans des cellules p53 nulle, inhibe l'apoptose induite par p73 (Costanzo et al., 2002). P73 peut réguler l'arrêt du cycle cellulaire par la régulation de l'expression de p21.

P73 pourrait également coopérer avec la protéine p53 en réponse aux agents génotoxiques. Cette idée est supportée par une étude qui a été menée par Flores et ses collaborateurs en 2002. Selon cette étude, l'induction de l'apoptose par p53 nécessiterait au moins un de ses homologues (Flores et al., 2002). Il y aurait donc deux classes de gènes cibles de p53 : certains, comme MDM2 et p21 seraient contrôlés par p53 même en l'absence de p73 (et de l'autre homologue de p53 : p63) et d'autres, comme BAX, NOXA et PERP, dont le contrôle par p53 nécessiterait la présence de p63 et de p73 (Flores et al., 2002). Il y a donc bien complicité entre les trois compères p53, p63 et p73 dans la réponse de la cellule aux dommages subis par l'ADN. Cependant une autre étude beaucoup plus récente a montré que l'apoptose dans des lymphocytes T n'implique aucune coopération apparente entre p53, p63 et p73 (Senoo et al., 2004). MDM2 peut interagir avec p73 et l'inhiber sans induire sa dégradation (Zeng et al., 1999).

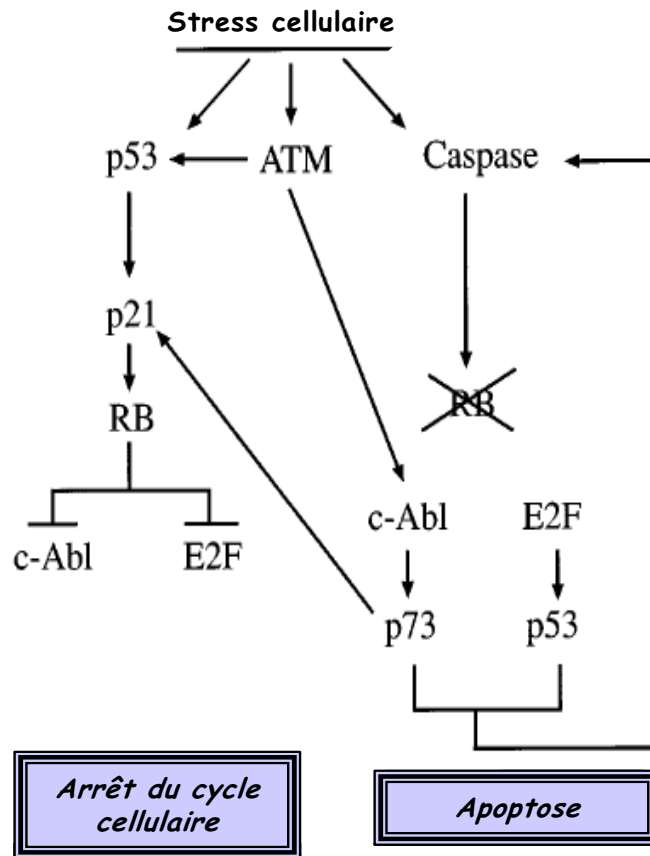


Figure 35 : Signalisation de c-Abl après un stress cellulaire : Voir section VII pour détails (D'après (Wang et al., 2000)).

PARTIE 3 : LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION STAT1

Introduction

Outre leur implication dans divers processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Espert et al., 2005, Steelman et al., 2004), les protéines STAT (Signal Transducers Activators of Transcription) sont associées à la transformation cellulaire et d'une manière plus générale à l'oncogenèse. En effet une étude relativement récente a montré l'implication évidente de STAT1, STAT3 et STAT5 dans la formation et la progression des tumeurs (Bromberg et al., 2000).

I. La voie JAK/STAT

La voie JAK/STAT est l'une des principales voies impliquées dans la transduction de signaux activés par des cytokines ou des facteurs de croissance. Elle régule des phénomènes physiologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, la migration et la mort des cellules (Espert et al., 2005). Elle est activée par une multitude de signaux : les IFN α , β et γ , de même que les cytokines et facteurs de croissance ayant comme récepteur un membre de la superfamille des récepteurs des cytokines (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13, IL-15, GM-CSF, etc.) (Leonard & O'Shea, 1998).

I.1. Les JAK

La famille des JAK (Janus Activating Kinase) comporte quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Leur structure est caractérisée par la présence d'un domaine catalytique (ou JH1) en position C terminale qui est responsable de la phosphorylation des substrats (Leonard & O'Shea, 1998) et d'un domaine pseudo-kinase (ou JH2) qui semble avoir des fonctions régulatrices (Figure 36) (Chen et al., 1998, Saharinen et al., 2000). Les différents JAK ont généralement des fonctions non-redondantes *in vivo*. Ces tyrosine kinases sont associées aux domaines cytoplasmiques de différents récepteurs, comme les récepteurs aux cytokines et les facteurs de croissance, dont elles assurent la transduction du message. Leur activation survient après stimulation du récepteur par son ligand, ce qui conduit à l'activation des STAT (Briscoe et al., 1996a, O'Shea et al., 2002). Les JAK phosphorylent également le récepteur sur des résidus tyrosines (Rawlings et al., 2004). Ces résidus sont ensuite reconnus par des

protéines contenant des domaines SH2 tels ceux des STAT. Les protéines STAT se fixent au récepteur et sont ensuite phosphorylées sur leurs résidus tyrosines par les JAK (O'Shea et al., 2002, Schindler, 2002).

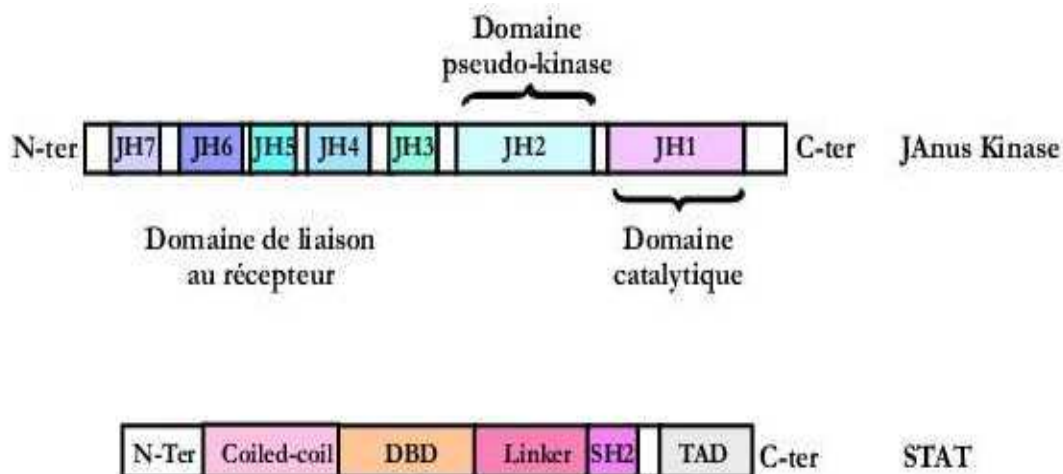


Figure 36 : Représentation schématique des JAK et STAT.

I.2. Les STAT

Les protéines STAT sont des facteurs de transcription présents sous forme latente monomérique dans le cytoplasme des cellules au repos. Les protéines STAT sont activées par divers stimuli extracellulaires tels que les cytokines et les facteurs de croissance. L'activation des STAT est médiée par la phosphorylation de résidus tyrosine et sérine présents dans la partie carboxy-terminale .

Il existe 7 différents membres de STAT codés par des gènes distincts : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6 dont le poids moléculaire varie entre 90 et 100 kDa (750 et 850 acides aminés) (Ihle, 2001). L'expression de ces gènes conduit à la synthèse de variants d'épissage. Des études de cristallographie ainsi que la comparaison des séquences protéiques ont révélé la présence de domaines conservés (Becker et al., 1998, Chen et al., 1998). Toutes les protéines STAT possèdent une structure commune organisée en six domaines : N-terminal, domaine coiled coil, domaine de fixation à l'ADN (DBD DNA Binding Domain) spécifique pour chaque STAT (Horvath, 2000), linker, SH2 (Src Homology Domain) et TAD (Transcriptional Activation Domain) (Becker et al., 1998, Chen et al., 1998) (Figure 36).

Malgré la forte homologie existante entre elles et la combinatoire de leur association, les différents STAT possèdent une spécificité de fonction. La contribution de chacune dans les processus cellulaires a été établie par invalidation des gènes correspondants chez la souris. Ainsi, il a été montré que STAT1 et STAT2 jouent un rôle prédominant dans la signalisation des interférons (Bromberg et al., 2002), STAT4 et STAT6 dans la polarisation, la transduction du signal des cytokines IL12 et IL4 respectivement, STAT3 dans l'embryogenèse et l'immunité (Teng et al., 2004a, Teng et al., 2004b). Enfin STAT5 dans la reproduction et la lactation (Liu et al., 1997) et dans la croissance de l'organisme et l'hématopoïèse (Baskiewicz-Masiuk et al., 2003, Kofoed et al., 2003).

Les protéines STAT peuvent se lier à deux séquences différentes situées dans la région promotrice des gènes qu'elles induisent. On retrouve la séquence GAS (Gamma-Interferon Activating Sequence) identifiée comme fixant STAT1 en réponse à l'interféron gamma (Darnell et al., 1994). Par la suite il a été découvert que tous les STAT à l'exception de STAT2 pouvaient s'y fixer. La deuxième séquence s'appelle ISRE (Interferon-Stimulated Response Element). Elle est reconnue par un complexe protéique composé de STAT1, STAT2 et p48 (membre de la famille des IRF pour Interferon Response Element) en réponse aux interférons IFN α/β .

La voie JAK/STAT peut être régulée par les protéines SOCS (Suppressor of Cytokine Signalling) qui peuvent se lier aux récepteurs ou aux JAK phosphorylés et empêcher le recrutement des STAT par un système de compétition ou bien l'inhibition de l'activité kinase des JAK (Espert et al., 2005), par les phosphatases SHP1 et SHP2 (SH2-domain Containing Phosphatase) qui déphosphorylent les récepteurs et/ou les JAK, et enfin, par les protéines PIAS (Aaronson & Horvath, 2002).

II. Le facteur de transcription STAT1

STAT1 est le premier membre décrit de la famille STAT comme étant activé en réponse aux interférons (Durbin et al., 1996, Meraz et al., 1996). Il joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire surtout la réponse antivirale, la prolifération et la mort cellulaire (Battle & Frank, 2002, Stephanou et al., 2001).

II. 1. Structure de la protéine STAT1

La protéine STAT1 est composée de 750 acides aminés et a une taille de 91 KDa. STAT1 subit un épissage alternatif qui aboutit à la formation de 2 isoformes : un isoforme α et un isoforme β . Ce dernier est tronqué au niveau de son domaine de transactivation C-terminal et est dépourvu du résidu serine 727, et de ce fait se comporte comme le dominant négatif de la forme alpha. L'isoforme alpha comprend (Figure 37) :

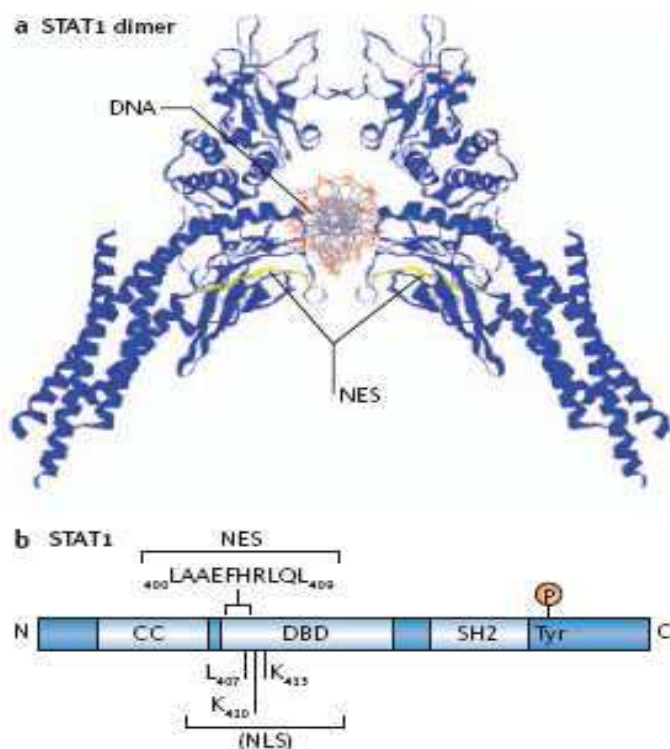


Figure 37 : Structure des domaines des protéines STAT et sites de fixation à l'ADN. (a) Structure tridimensionnelle du dimère de STAT1 fixé à l'ADN. La structure du noyau (acides aminés 130-712) montre la liaison d'un dimère de STAT1 à l'ADN

(b) Structure de STAT1. STAT : Signal Transducer of Activator of Transcription ; SH2 ; Src homology-2 domain ; CC, domaine coiled coil ; DBD ; DNA binding domain (D'après (Reich et al., 2006)).

- La partie N-terminale (entre aa1 et aa135) de STAT1 est impliquée dans l'interaction protéine-protéine et dans la formation de dimère STAT. En effet, la formation des tétramères STAT est importante pour la stabilité du complexe STAT-ADN et donc pour l'activité transcriptionnelle de STAT (John et al., 1999).
- La région située entre aa136 et aa317 constitue le domaine hélice double hélice. Ce domaine est impliqué dans l'association de la protéine Nmi (N-myc interacting protein), ce qui permet le recrutement de CBP et ainsi l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de STAT1 (Zhu et al., 1999).
- Le domaine de fixation à l'ADN est situé entre les résidus 318 et 488 (Horvath, 2000)

- La région située entre les résidus 489 et 576 sépare le domaine de fixation à l'ADN du domaine SH2 (src homology 2). Son rôle n'est pas très bien connu, cependant, il a été montré que des mutations au niveau de ce domaine affectent la fixation de STAT à l'ADN et inhibent ainsi l'activation des gènes cibles (Yang et al., 2002).
- Le domaine SH2, situé entre l'aa 577 et 683, est impliqué dans le recrutement de STAT par les récepteurs phosphorylés et dans la formation des dimères STAT/STAT (Horvath, 2000).
- Le domaine TAD est situé au niveau de l'extrémité C-terminale entre les résidus 684 et 750. Il est impliqué dans l'interaction avec d'autres facteurs de transcription et coactivateurs. Le mécanisme par lequel TAD régule l'activation transcriptionnelle n'est pas encore élucidé (O'Shea et al., 2002).

La phosphorylation du résidu tyrosine 701 est importante pour la dimérisation de STAT1, sa translocation vers le noyau ainsi que sa fixation à l'ADN (O'Shea et al., 1999). La phosphorylation du résidu sérine 727, également située au niveau du domaine TAD, serait nécessaire pour une activité transcriptionnelle optimale. En effet, la mutation de ce résidu réduit l'activité transcriptionnelle de 20% (Imada & Leonard, 2000, Wen et al., 1995). Parmi les partenaires protéiques susceptibles de se fixer sur le domaine TAD, on peut citer p300/CBP (CREB-binding Protein) (Zhang et al., 1995), MCM5 (Zhang et al., 1995) et BRCA1 (Ouchi et al., 2000).

II. 2. Voies d'activation de STAT1

La protéine STAT1 peut être activée par plusieurs facteurs. La phosphorylation du résidu tyrosine 701 peut être assurée par plusieurs tyrosine kinase comme les JAK, les récepteurs tyrosine kinase EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) (Choudhury et al., 1998, Quelle et al., 1995) ainsi que des tyrosines kinase « non récepteurs » de la famille src ou Abl. L'action de ces tyrosines kinases peut se faire soit directement soit par l'intermédiaire d'autres tyrosines kinases JAK et ERK (Shuai & Liu, 2003). Une activation constitutive a été observée dans les cellules transformées par des virus tels que l'EBV (Weber-Nordt et al., 1996), HTLV1 (Migone et al., 1995) et le virus Abelson (Danial & Rothman, 2000).

II.2.1. Activation de STAT1 par les interférons

Les IFN sont classés en deux types selon leurs propriétés antigéniques et biologiques. Ceux de type I, les IFN α et IFN β et de type II ou IFN γ .

La compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à l'activation des gènes par les IFN et par conséquent le rôle de STAT1 dans la réponse aux interférons a été clairement établie par l'utilisation de lignées cellulaires mutées (Darnell et al., 1994) et de souris transgéniques déficientes en STAT1 (Durbin et al., 1996, Meraz et al., 1996). Les souris KO-STAT1 sont très sensibles aux infections virales et bactériennes et à la formation de tumeurs. Les cellules sensibles à l'IFN portent à leur surface des récepteurs spécifiques des IFN de type I (deux chaînes, IFN α R1 et IFN α R2) ou de type II (IFN γ R1 et IFN γ R2). Chacun des récepteurs est associé à des protéines kinases cytoplasmiques (Tyk2, JAK1 et JAK2) de la famille des JAK. Pour les IFN de type I, JAK1 s'associe avec la chaîne IFN α R2 et interagit avec Tyk2 associée à IFN α R1. Pour l'IFN γ , JAK1 interagit avec JAK2, JAK1 est associée à la chaîne alpha et JAK2 à la chaîne bêta.

Après fixation des IFN sur leurs récepteurs, les kinases associées (Tyk2, JAK1 et JAK2) sont phosphorylées. Cette activation est suivie d'une phosphorylation du récepteur créant un site d'ancrage pour les protéines appartenant à la famille des STAT. Pour les IFN de type I, STAT2 puis STAT1 sont phosphorylés, migrent vers le noyau et forment un complexe avec la protéine p48, de la famille des facteurs de transcription IRF (Interferon Regulatory Factor). Ce complexe, dénommé ISGF3, se fixe sur les séquences d'ADN dites ISRE (Interferon-Stimulated Response Element, AGTTTCNNTTTCNC/T) et active la transcription des gènes répondant à l'IFN de type I (Li et al., 1998). Sous l'effet de l'IFN γ , seul STAT1 est phosphorylé, forme des homodimères, transloque vers le noyau et se fixe sur la séquence palindromique GAS (Gamma Interferon Activation site, TTNCNNNAA) activant la transcription des gènes réponse à l'IFN γ (Figure 38) (Chatterjee-Kishore et al., 2000).

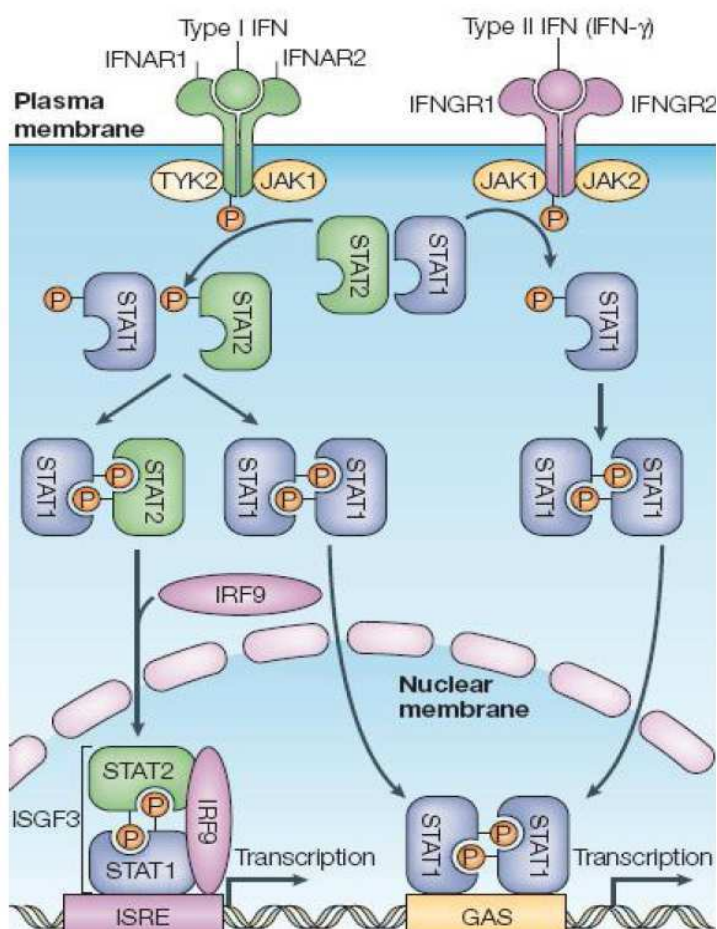


Figure 38 : Transduction du signal par les récepteurs aux interférons (IFN) de type I et II (D'après (Decker et al., 2005)).

II.2.2. Activation de STAT1 par v-Abl et BCR-Abl

STAT1, au même titre que les autres protéines de la famille STAT, peut être activé par d'autres tyrosines kinases telles que PDGFR, c-kit et v-src. v-Abl et BCR-Abl sont les deux formes oncogéniques de c-Abl et sont capables de transformer les cellules hématopoïétiques et induire une prolifération cellulaire indépendante des cytokines (Pierce et al., 1985, Cook et al., 1985). Ainsi, v-Abl codée par le virus Abelson, peut transformer les cellules B et myéloïdes et induire l'activation constitutive de JAK1, JAK3, STAT1, STAT2 et STAT5 (Danial & Rothman, 2000). STAT1 peut être activé par l'oncogènes v-Abl, soit par interaction directe avec la partie C-terminale soit indirectement par activation des JAK par Abl. Dans les cellules pre-B transformées par le virus A-MuLv (Abelson murine leukemia virus), JAK1 et v-Abl peuvent former un complexe protéique ce qui suggère que JAK1 peut être un substrat de v-Abl. De plus, Danial et ses collaborateurs ont mis en évidence un nouveau domaine dans la partie carboxy-terminale de v-Abl qui permet l'interaction avec

JAK1 (Danial & Rothman, 2000). Ces données n'excluent pas une activation directe des STAT par v-Abl ou BCR-Abl.

BCR-Abl peut également activer constitutivement STAT1 et STAT5 indépendamment de la stimulation des cellules et sans activer les JAKs (Carlesso et al., 1996, Ilaria & Van Etten, 1996, Nieborowska-Skorska et al., 1999). L'expression du dominant négatif de JAK1 n'a aucun effet sur l'activation des STAT par le BCR-Abl (Ilaria & Van Etten, 1996). Dans ce cas, l'activation des STATs par BCR-Abl nécessite la présence des domaines SH2 et SH3 (Nieborowska-Skorska et al., 1999). Ceci suggère l'incapacité de v-Abl d'activer directement STAT1 à cause de l'absence du domaine SH3 (Figure 39). Concernant la protéine cellulaire c-Abl, son rôle dans l'activation de STAT1 n'était pas bien défini au début de ma thèse.

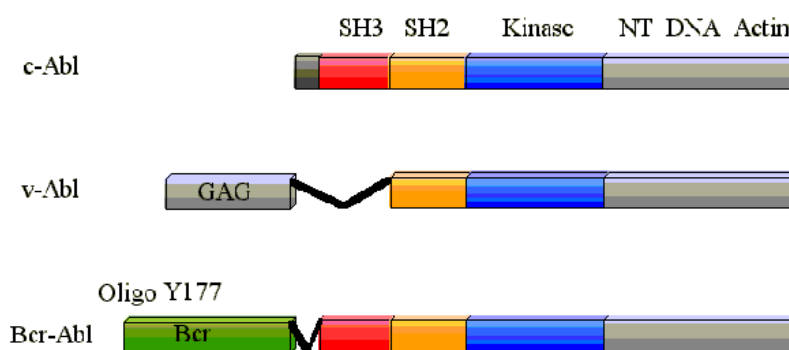


Figure 39 : Comparaison entre la structure de c-Abl et de ses variants oncogéniques v-Abl et BCR-Abl.

II.3. Régulation de STAT1

II.3.1. Les modifications post-traductionnelles

Les protéines STAT, d'une façon générale, peuvent subir une série de modifications post-traductionnelles, capables de moduler leur activité transcriptionnelle. Ces modifications incluent la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation et la SUMOylation.

II.3.1.1. Phosphorylation/déphosphorylation

Suite à la stimulation par les cytokines, STAT1 est phosphorylé au niveau de la tyrosine 701 par les JAK. Cette phosphorylation permet le passage moléculaire entre la forme cytosolique inactive et la forme active capable d'induire l'expression des gènes cibles. Des études

récentes ont montré que la déphosphorylation du résidu tyrosyl de STAT1 par une phosphatase nucléaire permet l'exportation de STAT1 vers le cytoplasme, ce qui montre le rôle du résidu tyrosyl 701 dans la rétention nucléaire de STAT1 (McBride et al., 2002).

STAT1 est également phosphorylé au niveau de la sérine 727 par les MAPKs. Des expériences de mutagenèse ont montré que la phosphorylation de la sérine 727 augmente significativement l'activité transcriptionnelle de STAT1 en réponse aux interférons. Parmi les nombreuses kinases capables de phosphoryler la sérine 727 de STAT1, p38MAPK est la kinase qui est potentiellement impliquée dans la phosphorylation de STAT1 suite aux stress cellulaires tels que l'irradiation par les UV, LPS et le TNF- α . Cependant, il est établi que la phosphorylation de la sérine 727 s'effectue indépendamment des MAPK en réponse aux interférons. D'autres études ont montré que la kinase PKC δ pourrait être impliquée dans la phosphorylation de STAT1 en réponse à l'Etoposide et LPS (Rhee et al., 2003).

Elle est également impliquée dans la phosphorylation de la sérine 727 après stimulation par les interférons α , β et γ (Deb et al., 2003, Uddin et al., 2002). La déphosphorylation de STAT1 par des phosphatases a pour effet d'atténuer son activité. En 2002, Hoeve et ses collaborateurs (Hoeve et al., 2002) ont pu isoler une tyrosine phosphatase nommée TC45 (correspond à une forme nucléaire de la phosphatase Tc-PTP (T cell protein tyrosine phosphatase) à partir des extraits nucléaires de la lignée HeLa. Cette enzyme peut déphosphoryler STAT1 *in vivo* et *in vitro*. SHP-2 est une autre phosphatase capable de déphosphoryler STAT1 (Wu et al., 2002, You et al., 1999) mais également STAT2 et STAT5A (Chen et al., Y 2003). L'association entre STAT1 et SHP-2 a été observée d'une manière prédominante dans le noyau après exposition des cellules (lignée A431) à l'EGF ou l'IFN γ . Les fibroblastes déficients en SHP-2 montrent une forte augmentation de la phosphorylation de JAK1 après stimulation par l'IFN γ (You et al., 1999). Ainsi, il a été montré que JAK1 et JAK3 sont également des substrats des phosphatases suggérant que les Tc-PTP et SHP-2 régulent la voie JAK/STAT en agissant sur les JAK et les STAT au même moment.

II.3.1.2. Ubiquitination, ISGylation

L'ubiquitination des STAT en général et de STAT1 en particulier a été mise en évidence pour la première fois en 1996 par l'équipe de Kim TK (Kim & Maniatis, 1996). Récemment, il a été montré que l'enzyme ubiquitine E3 ligase nommée SLIM (Tanaka et al., 2005) peut

promouvoir l'ubiquitination et la dégradation de STAT1 et de STAT4. Chez les souris déficientes en SLIM, on constate une augmentation de la quantité protéique et de l'activité transcriptionnelle de STAT1. Ceci suggère un rôle de l'ubiquitination dans la régulation négative de l'activité de STAT1. Certains virus induisent l'ubiquitination afin de détourner la voie des IFNs et échapper ainsi à la réponse immunitaire (Parisien et al., 2002a, Ulane & Horvath, 2002).

STAT1 peut être modifié par ISGylation (Malakhov et al., 2003). ISG15 est une protéine précurseur de 17kDa inductible par les interférons dont le clivage par une protéase donne une protéine de 15 kDa. C'est un membre de la famille des protéines *ubiquitine like* comme SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) ou Nedd8.

Contrairement à l'ubiquitination, l'ISGylation n'induit pas la dégradation de la protéine dans le protéasome. Son rôle exact n'est pas encore bien compris. Elle pourrait jouer un rôle de régulateur positif de STAT (Malakhov et al., 2003, Malakhova et al., 2003). Une étude récente a montré que l'ISGylation n'est pas importante pour la signalisation JAK/STAT1 et l'activation de STAT1 en particulier (Kim et al., 2006).

II.3.1.3. SUMOylation et Méthylation

La SUMOylation de STAT1 a été décrite par deux travaux distincts (Rogers et al., 2003, Ungureanu et al., 2003). STAT1 peut être SUMOylé au niveau de son résidu lysine 703 par les PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) (Rogers et al., 2003, Ungureanu et al., 2003), identifiées comme des inhibiteurs de la famille des STATs, puis comme E3 ubiquitine ligase (Kahyo et al., 2001). La SUMOylation de STAT1 modifie son transport nucléaire (SUMO peut servir de signal d'export nucléaire) et régule ainsi son activité transcriptionnelle (Sachdev et al., 2001). Récemment, Mowen et collaborateurs ont démontré que les dimères de STAT1 étaient méthylés sur une arginine conservée 31 (Mowen et al., 2001). Cette méthylation augmentait la capacité des dimères à lier l'ADN et à initier la transcription de gènes suite à une stimulation à l'IFN α/β . Ces auteurs ont également observé que cette modification de STAT1 empêchait sa liaison à PIAS1 (Mowen et al., 2001).

II.3.2. Le transport nucléo-cytoplasmique de STAT1

La forme latente de STAT1 est monomérique et localisée dans le cytoplasme. Des analyses FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching) et FLAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont montré que STAT1 est en perpétuel mouvement entre le noyau et le cytoplasme (Lillemeier et al., 2001). La présence de la forme non phosphorylée dans le noyau peut être due à plusieurs facteurs tels que la dimérisation avec STAT phosphorylés ou l'association avec d'autres protéines comme IRF1 par exemple (Chatterjee-Kishore et al., 2000, Marg et al., 2004). Marg et ses collaborateurs ont proposé un modèle selon lequel la forme latente de STAT1 non phosphorylée transite régulièrement entre le cytosol et le noyau par des interactions directes avec les nucléoporines Nup153 et Nup 214. L'export de STAT1 se fait par transport actif nécessitant de l'énergie et il est assuré par la protéine CRM1 suite à une interaction directe avec le motif NES de STAT1, ce qui permet l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme. La déplétion de l'ATP ou l'utilisation d'un inhibiteur de CRM1 (Leptomycin B) induit l'accumulation de STAT1 dans le noyau. Ceci suggère aussi que le taux d'influx de STAT1 dans le noyau dans les cellules non stimulées est influencé par un gradient de concentration entre le noyau et le cytoplasme (Figure 40) (Marg et al., 2004).

Après stimulation par les cytokines par exemple, la translocation des protéines STAT dans le noyau se produit rapidement après leur phosphorylation et leur dimérisation (Bromberg & Darnell, 2000). Ceci nécessite une liaison avec l'importine- $\alpha 5$, une des sous-unités du complexe de transport nucléo-cytoplasmique pour faciliter son passage dans le noyau (McBride et al., 2002). Des études par mutagenèse ont montré que les résidus Leu407, Lys410 et Lys413 à l'intérieur du site de liaison à l'ADN, sont indispensables pour la translocation nucléaire de STAT1 phosphorylé (Fagerlund et al., 2002). Une fois dans le noyau, des séquences spécifiques d'ADN entrent en compétition avec l'importine $\alpha 5$ pour se fixer à STAT1 (McBride et al., 2002). La déphosphorylation de STAT1 a lieu dans le noyau et c'est l'évènement qui conditionne l'export de STAT1 vers le cytoplasme (Haspel & Darnell, 1999, Lillemeier et al., 2001) par CRM1 (Figure 41).

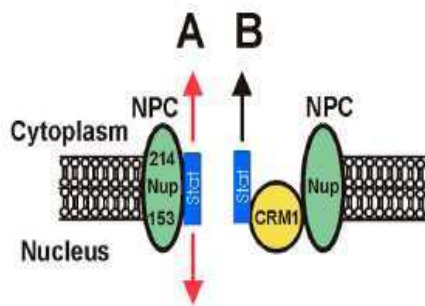


Figure 40 : Modèle du transport nucléo-cytosolique de STAT1 :

- (A) La forme non phosphorylée de STAT1 transite entre le noyau et le cytosol via des interactions avec Nup153 et Nup214.
- (B) L'export de STAT1 non phosphorylé peut se faire également par un autre mécanisme faisant intervenir l'exportine CRM1 (D'après (Marg et al., 2004)).

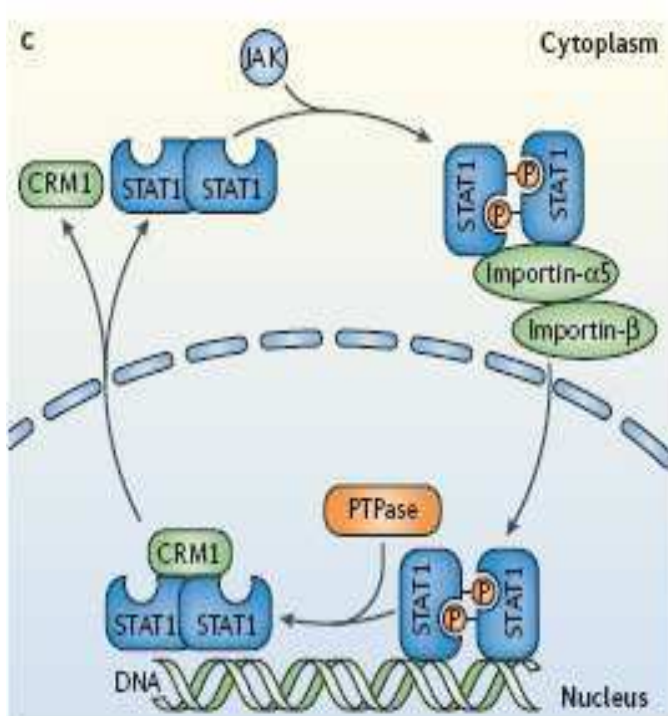


Figure 41 : Le trafic cellulaire de STAT: STAT1 est phosphorylé par JAK après stimulation. STAT1 interagit avec l'importine α et est importé vers le noyau où il va se fixer sur les promoteurs de ses gènes cibles sous l'action d'une tyrosine déphosphatase PTPase, STAT1 est déphosphorylé puis transporté vers le cytosol via l'exportine CRM1 (D'après (Reich et al., 2006)).

Récemment, la présence des homo ou hétéro-dimères inactifs non phosphorylés de STAT1 a été démontré dans le cytoplasme en absence de stimulation. Ceci a été confirmé par des études de cristallographie. Le mutant STAT1 Y701F où le résidu tyrosine a été remplacé par un résidu phénylalanine peut former des dimères inactifs avec STAT2 ce qui suggère que la dimérisation est indépendante de la phosphorylation (Stancato et al., 1996). On peut supposer que les dimères de STAT1 cytoplasmiques peuvent avoir un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes. Ceci peut se faire par un mécanisme indirect sans fixation à l'ADN.

III. Mécanismes de régulation de la mort cellulaire par STAT1

Les interférons sensibilisent la cellule à l'apoptose induite par plusieurs facteurs tels que TNF- α , Fas et TRAIL (Battle & Frank, 2002, Ossina et al., 1997, Sironi & Ouchi, 2004, Suk et al., 2001a, Suk et al., 2001b). Par exemple, le cotraitement de la cellule par TNF- α et l'IFN γ induit l'apoptose, effet qui est reversé par la transfection de la cellule par la protéine STAT1 mutée incapable d'être phosphorylée. Sironi et ses collaborateurs ont exprimé une protéine STAT1 constitutivement active et ont constaté une augmentation de l'apoptose induite par l'IFN gamma (Sironi & Ouchi, 2004). L'activation de STAT1 par l'IFN γ augmente l'activation des caspases et/ou inhibe la voie NF- κ B (Kumar et al., 1997, Suk et al., 2001a). D'autres études beaucoup plus récentes ont montré l'implication de STAT1 dans l'induction de l'apoptose en réponse à d'autres stimuli comme l'hypoxie, des dommages d'ADN (Janjua et al., 2002, Stephanou et al., 2001, Stephanou et al., 2000b, Townsend et al., 2004). STAT1 peut induire la mort cellulaire par une autre voie non apoptotique indépendante des caspases et qui fait intervenir les radicaux libres oxygénés (Kim & Lee, 2005, Simon et al., 1998). STAT1 β , dominant négatif de STAT1, inhibe l'apoptose induite par la Fludarabine* (Baran-Marszak et al., 2004).

Le processus par lequel STAT1 induit la mort cellulaire semble impliquer deux mécanismes : un qui dépend de l'activité transcriptionnelle de STAT1 et donc de l'expression de gènes cibles (caspases, récepteurs de mort cellulaire, iNOS, p21 et BCL-X_L) et un autre qui fait appel aux interactions protéine-protéine.

III.1. Mécanisme dépendant de l'activité transcriptionnelle de STAT1

La plupart des travaux qui ont porté sur l'étude de la relation entre STAT1 et les caspases se sont focalisés essentiellement sur les caspases 1 et 11. Ces dernières sont impliquées dans certaines signalisations des cytokines tels que l'IL1 et l'IL18 (Martinon & Tschopp, 2004, Pomerantz et al., 2001) et dans l'activation des autres caspases effectrices (Lee et al., 2001, Suk et al., 2001a, Suk et al., 2001b). STAT1 régule aussi directement l'expression des caspases effectrices 3 et 7 (Huang et al., 2000, Kumar et al., 1997, Refaeli et al., 2002). Une étude menée sur une lignée cellulaire humaine déficiente en STAT1 a montré que celle-ci est résistante à l'apoptose induite par le TNF- α et l'Actinomycine D. La restauration de

l'expression de STAT1 induit l'apoptose dépendante du TNF- α ainsi que l'expression des caspases. Dans cette lignée cellulaire, la fonction de STAT1 comme régulateur transcriptionnel des caspases, serait indépendante de sa phosphorylation et de sa dimérisation. Ce modèle a été appuyé par une autre étude qui a montré que la protéine STAT1 non phosphorylée induit l'expression constitutive de la protéine virale du virus d'Epstein Barr LMP2 par une simple fixation au niveau de l'élément GAS (Chatterjee-Kishore et al., 2000). Des souris déficientes en STAT1 sont résistantes à l'apoptose induite par le TNF α . Ceci est due à l'expression extrêmement réduite des protéases à cystéine, les caspases. La transfection de cellules STAT1 $-/-$ avec des mutants de STAT1 codant pour des protéines dépourvues du domaine indispensable à sa dimérisation restitue l'expression normale des caspases et le phénotype apoptotique en réponse au TNF α . Ces résultats montrent que STAT1, soit sous forme de monomère, soit en recrutant d'autres partenaires, active la transcription de gènes pro-apoptotiques. Ils suggèrent également que sous cette forme monomérique cytoplasmique, STAT1 joue un rôle pour l'instant inconnu dans l'activation des voies apoptotiques.

Dans plusieurs lignées cellulaires, l'activation de STAT1 provoque l'apoptose via la régulation de l'expression et l'activation des récepteurs de mort cellulaire et de leurs ligands. L'activation de STAT1 par l'IFN γ par exemple, conduit à l'induction de Fas et FasL dans plusieurs lignées cellulaires : les fibroblastes (Xu et al., 1998), les cellules microgliales (Lee et al., 2000) et les cardiomyocytes (Stephanou et al., 2000b). De plus, STAT1 est capable d'induire l'expression d'autres récepteurs de mort cellulaire autres que Fas tels que le récepteur TRAIL et son ligand TRAIL-R ainsi que le récepteur DR5 (Meng et al., 2000).

STAT1 peut activer l'apoptose par l'induction de l'expression de l'enzyme iNOS (Inductible Nitric Oxide Synthase) qui est responsable de la production de NO. Celui-ci étant un potentiel régulateur de l'apoptose dans une grande variété de lignées cellulaires comme les macrophages par exemple. Dans les macrophages, STAT1 activé par l'IFN γ ou LPS permet l'expression de iNOS via son gène cible IRF1 (Lee et al., 2001, Ohmori & Hamilton, 2000, Suk et al., 2001a). Le mécanisme par lequel il induit l'apoptose passe par la voie mitochondriale et par la protéine p53 (Brown & Borutaite, 2001, Brune & Schneiderhan, 2003).

Il est également capable de réguler l'expression de gènes pro-prolifératifs tel que le gène BCL-X_L (Fujio et al., 1997). Le mécanisme de cette régulation reste encore inconnu,

probablement à cause des résultats contradictoires qui suggèrent une régulation à la fois positive et négative de BCL-X_L par STAT1. Cependant, plusieurs travaux suggèrent une régulation négative du promoteur de BCL-X_L par STAT1 et positive par STAT3 (Hong et al., 2002, Stephanou et al., 2000a).

Une autre cible cellulaire de STAT1 consiste en l'inhibiteur des CDK (Cyclin Dependent Kinase), la protéine p21. Il a été démontré que l'activation de STAT1 est associée à une augmentation de l'expression de la protéine p21 (Agrawal et al., 2002, Chin et al., 1996, Huang et al., 2000), ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Les travaux de Chin et ses collaborateurs ont montré que la protéine STAT1 reconnaît 3 sites de fixation très conservés au niveau du promoteur du gène p21 (Chin et al., 1996). Le mécanisme par lequel p21 induit l'apoptose reste encore incompris, et il semble que cela impliquerait la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase 3 (Agrawal et al., 2002, Kim et al., 2001) (Figure 42).

III.2. Mécanisme indépendant de l'activité transcriptionnelle de STAT1.

STAT1 peut induire l'apoptose par des interactions protéine-protéine. Il peut ainsi agir comme un co-activateur pro-apoptotique. Il a été montré que STAT1 peut interagir directement avec TNFR1 et TRADD inhibant la voie NF- κ B et son signal pro-prolifératif (Wang et al., 2000), et ainsi favoriser l'apoptose.

Dans les cellules déficientes en STAT1, la formation du complexe TRADD, TRAF2 et RIP est très élevée après traitement par le TNF α ce qui aboutit à l'activation de la voie NF- κ B. A l'opposé, la surexpression de STAT1 bloque cette activation. Ceci suggère le rôle de STAT1 comme médiateur dans l'induction de l'apoptose par TNF α probablement par l'inhibition de la prolifération induite par NF- κ B (Suk et al., 2001a, Suk et al., 2001b). Récemment, il a été rapporté que le recrutement de STAT1 par le complexe TNFR1 peut être reversé par l'IFN γ (Wesemann & Benveniste, 2003). En effet, l'activation de STAT1 par l'IFN γ provoque sa translocation vers le noyau et sa déplétion du cytoplasme, ce qui conduit à une activation optimale de NF- κ B par le TNF α .

STAT1 interagit avec les enzymes HAC et HDAC (Korzus et al., 1998, Nusinzon & Horvath, 2003). Kramer et ses collaborateurs ont montré que l'activation de STAT1 en présence d'inhibiteur de HDAC favorise l'interaction avec p65 et inhibe ainsi la voie NF- κ B. Cette

inhibition est due à l'incapacité de p53 d'être importé dans le noyau et d'induire l'expression de ses gènes cibles anti-apoptotiques (Kramer et al., 2006) (Figure 42).

L'étude menée par Townsend et ses collaborateurs a montré que STAT1 est phosphorylé en sérine 727 en réponse à des dommages d'ADN et optimise d'une façon significative l'apoptose en réponse à des dommages de l'ADN et ceci par l'inhibition du régulateur négatif de p53, MDM2 (Townsend et al., 2004). Il a été montré que STAT1 interagit physiquement avec p53. Cette interaction nécessite le domaine C-terminal de STAT1. L'effet pro-apoptotique de STAT1 viendrait d'une part de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 qui favorise ainsi l'expression de gènes cibles pro-apoptotiques tels que BAX, NOXA et Fas ; et d'autre part de l'activation de la transcription de p21, cible commune de STAT1 et le suppresseur de tumeur p53. Une autre étude a montré que STAT1 sensibilise les cellules B infectées par le virus d'Epstein Barr (EBV) à l'apoptose induite par l'agent anticancéreux Fludarabine* et régule également l'activation de p53. Ceci est reversé par la surexpression de l'isoforme STAT1 β (Baran-Marszak et al., 2004). Comme il a été mentionné antérieurement (paragraphe modifications post-traductionnelles de STAT1), la protéine PIAS1, qui est un partenaire protéique de STAT1, peut également interagir et modifier p53 et son homologue p73 (Kahyo et al., 2001, Munarriz et al., 2004).

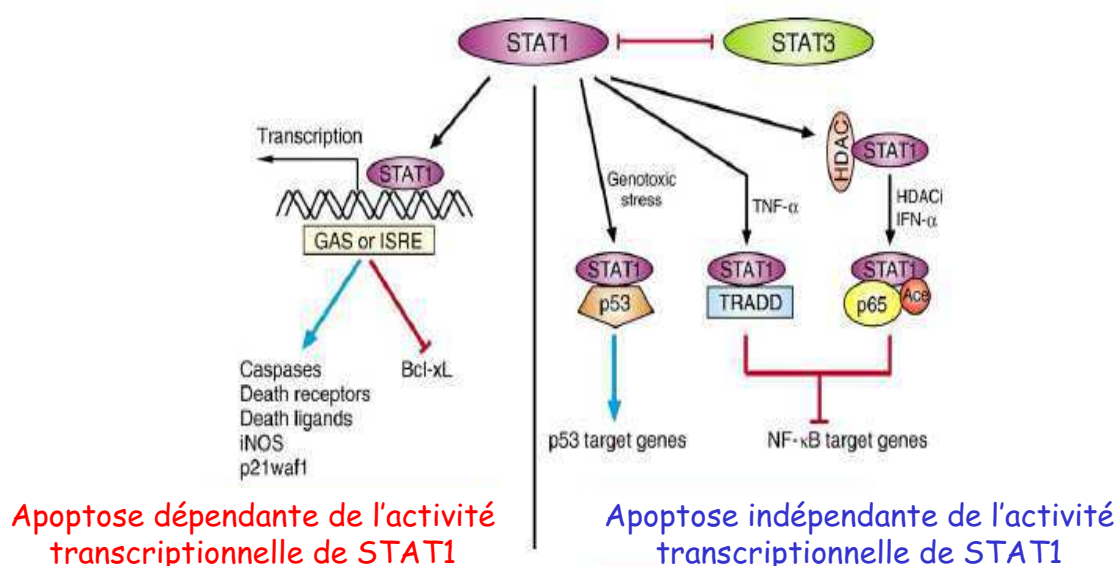


Figure 42 : Mécanismes de régulation de l'Apoptose par STAT1 (D'après (Kim et al., 2007)).

IV. STAT1 et oncogénèse

De part son rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose, STAT1, contrairement aux autres STAT, peut être qualifié de suppresseur de tumeur (Bromberg & Darnell, 2000). Une dérégulation de sa signalisation peut conduire au développement de tumeurs telles que le cancer de sein, les myélomes, les leucémies et le lymphome de Burkitt associé à l'EBV (Gouilleux-Gruart et al., 1996). Shankaran et ses collaborateurs ont montré que dans les cellules cancéreuses humaines, STAT1 n'est pas activé en réponse aux interférons (Shankaran et al., 2001). Ces cellules sont également beaucoup plus réceptives aux agents carcinogènes. Les nombreuses études menées sur des cellules déficientes en STAT1 ont apporté plusieurs éléments de réponse quant au rôle de STAT1 dans la cancérisation cellulaire. Les souris « knockout » pour le gène STAT1 sont incapables de développer spontanément des tumeurs et développent plutôt des tumeurs transplantées (Kaplan et al., 1998). Elles sont sensibles aux infections virales et pathogènes intracellulaires (Durbin et al., 1996).

V. IRF1 : gène cible de STAT1

V.1. Généralités

IRF1 appartient à la famille IRF (Interferon Response Factor). Cette famille compte neuf membres, IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, ICSPB (Interferon consensus sequence binding protein) et p48, ainsi que deux homologues viraux, vIRF1 et vIRF2 (Lohoff & Mak, 2005, Taniguchi et al., 1997). L'IRF1 est le premier membre de la famille des IRF identifié comme pouvant activer les gènes de l'IFN de type I (Miyamoto et al., 1988). C'est d'ailleurs, un gène cible de STAT1. Structuellement, chaque IRF contient un domaine de liaison à l'ADN bien conservé d'environ 120 acides aminés localisé dans la partie N-terminale et formant un motif hélice-boucle-hélice. Cette région reconnaît une séquence d'ADN consensus (G(A)AAAG/CT/CGAAAG/CT/C) connue comme l'élément de réponse stimulé par l'IFN (ISRE ou IRF-E = *IFN-stimulated response element*) (Taniguchi & Takaoka, 2001) car il a été tout d'abord identifié dans les promoteurs de gènes induits par la signalisation des IFN de type I (Decker et al., 2005, Taniguchi & Takaoka, 2001). Les ISRE sont également trouvés dans les promoteurs des gènes qui codent pour les IFN de type I eux-mêmes, tout comme dans les promoteurs de plusieurs autres gènes qui sont impliqués dans l'immunité et l'oncogénèse.

Contrairement aux autres membres de la famille IRF, IRF1 et IRF2 sont dépourvus d'un domaine situé dans la partie C-terminale et qui est responsable des interactions homo- et hétéromériques avec d'autres membres de la famille ou des facteurs de transcription comme PU1 et STAT (Mamane et al., 1999, Taniguchi & Takaoka, 2001).

V.2. Activation et rôles d'IRF1

IRF1 est un activateur transcriptionnel exprimé à des taux très faibles dans plusieurs types cellulaires et peut être induit par de nombreux stimuli comme une infection virale, les IFN ou l'ARN double brin (présents lors d'une infection virale). L'expression de son « antagoniste » IRF2 est constitutive mais peut être induite par les IFN de type I et par une infection virale (Harada et al., 1989, Miyamoto et al., 1988). Dans les cellules, il existe un équilibre entre les quantités d'IRF1 et d'IRF2 permettant de contrôler leur activité transcriptionnelle. La surexpression d'IRF1 conduit à un blocage de la prolifération cellulaire alors que les cellules qui surexpriment IRF2 adoptent un phénotype de transformation oncogénique. La capacité d'IRF1 de se fixer à l'ADN peut être augmentée par l'interaction avec TFIIB, composant de la machinerie transcriptionnelle (Wang et al., 1996).

L'induction de l'expression du gène IRF1 ainsi que son activation se font via la voie JAK/STAT après stimulation par l'IFN γ . Les gènes cibles d'IRF1 dans cette voie sont IFN β (Fujita et al., 1989, Miyamoto et al., 1988), RNA dependent protein kinase PKR (Beretta et al., 1996, Kirchhoff et al., 1995) et 2-5 synthétase (Coccia et al., 1999, Wang & Floyd-Smith, 1997). IRF1 peut être activé par une autre voie de signalisation impliquant la sérine thréonine kinase ATM, après dommages d'ADN (Pamment et al., 2002).

En plus de son rôle comme médiateur de la réponse antivirale (Fujita et al., 1989, Miyamoto et al., 1988), IRF1 est impliqué dans divers processus cellulaires : régulation du cycle cellulaire (Stevens & Yu-Lee, 1992, Stevens & Yu-Lee, 1994), l'apoptose (Kirchhoff & Hauser, 1999; Tamura et al., 1996); développement et maturation des lymphocytes (Matsuyama et al., 1993); la susceptibilité cellulaire à la transformation par un oncogène (Tanaka et al., 1994) et la réponse aux agents génotoxiques (Tanaka et al., 1996). IRF1 est notamment impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire telle que la sélection des lymphocytes T et leur maturation (Fearon et al., 1996, Matsuyama et al., 1993). C'est un modulateur puissant du développement et de la maturation fonctionnelle des cellules myéloïdes dendritiques (MDC). En effet, des souris déficientes en l'IRF1 présentaient une prédominance des cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC) et une réduction sélective de

MDC. Des DC spléniques IRF1^{-/-} étaient incapables de finir leur maturation et avaient des caractéristiques plasmacytoïdes et tolérogéniques après une infection virale *ex vivo* et *in vivo* (Testa et al., 2004). IRF1 joue un rôle primordial dans la réponse immunitaire antivirale induite par les interférons et ceci par l'expression de gènes cibles tels que iNOS et GBP (Guanylate Binding Protein). Il intervient également dans la réponse antibactérienne médiée par les interférons de type I et II (Kamijo et al., 1994).

V.2.1. IRF1 suppresseur de tumeur et la régulation de l'apoptose

Des études récentes ont montré que IRF1 peut jouer le rôle d'un suppresseur de tumeur capable de réguler l'apoptose ou la transformation induite par un oncogène (Taniguchi et al., 1997). Initialement, ceci a été démontré par des expériences de transformation des cellules NIH3T3 et l'apparition de tumeur chez des souris nude suite à la surexpression d'IRF2. Ceci a été reversé par l'expression de IRF1 (Harada et al., 1993). IRF1 peut aussi reverser l'effet oncogène de c-myc et fosB (Weinberg et al., 1985). De part son rôle de médiateur transcriptionnel des interférons, IRF1 possède des propriétés antiprolifératives lorsqu'il est surexprimé *in vivo* ou *in vitro* (Harada et al., 1993, Kirchoff et al., 1993). De plus, il a été trouvé que IRF1 induit l'apoptose par la régulation de l'expression du gène codant la caspase 1. L'équipe de Harada (Harada et al., 1993) a quantifié l'expression d'IRF1 à des stades différents du cycle cellulaire. Le pic d'expression d'IRF1 est observé dans les cellules en arrêt puis IRF1 baisse après stimulation des cellules par le sérum et reprise du cycle cellulaire. Afin d'étudier le rôle d'IRF1 dans le cycle cellulaire, des études ont été menées sur des cellules embryonnaires (MEF) dérivant de souris IRF^{-/-}. Ces cellules présentent le même phénotype que celles dérivées des souris p53^{-/-}, et on observe une absence d'arrêt du cycle cellulaire en réponse à des dommages d'ADN. Les expressions des deux facteurs de transcription IRF1 et P53 sont indépendantes l'une de l'autre, cependant IRF1 et p53 régulent l'expression du gène p21 après irradiation gamma (Tanaka et al., 2005). Ainsi, il existe une convergence fonctionnelle entre p53 et IRF1 dans la régulation du cycle cellulaire et ceci par l'activation de gènes communs.

Du point de vue physiologique, p53 et IRF1 sont impliqués dans des processus distincts. Par exemple, IRF1 est impliqué dans la réponse antivirale et antibactérienne, ce qui n'est pas le cas de p53. P53 est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, fonction qui demeure intacte dans les cellules IRF1^{-/-}. Par ailleurs, les deux coopèrent dans l'induction de l'apoptose induite par les dommages d'ADN dans les populations lymphocytaires et dans les MEF exprimant l'oncogène Ha-ras (Tanaka et al., 1994). Une autre étude a montré également une

collaboration fonctionnelle entre p53 et IRF1 dans l'arrêt du cycle en G1 après irradiation des cellules (Taniguchi et al., 1997). Récemment, il a été montré que, suite à un stress génotoxique induit par l'Etoposide ou l'irradiation, ATM assure la coordination entre l'activation de p53 et IRF1 et l'induction de l'expression de p21. L'expression d'IRF1 en ARNm et en protéine ainsi que sa demie-vie augmentent d'une manière dépendante d'ATM. Dans les cellules déficientes en ATM soumises aux mêmes traitements génotoxiques, l'expression d'IRF1 et son activité ne sont pas affectées. La réponse virale par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT et IRF1 demeure intacte dans ces cellules. Le travail réalisé par Pamment et ses collaborateurs souligne clairement l'implication d'IRF1 dans la réponse aux dommages d'ADN et la coopération entre p53 et IRF1 dans l'induction de l'apoptose et enfin l'activation d'IRF1 dépendante de l'activation d'ATM (Pamment et al., 2002). On peut noter que le facteur de transcription régulant l'expression d'IRF1 au cours de la réponse cellulaire aux dommages d'ADN n'est pas encore identifié.

Les lymphocytes sont particulièrement susceptibles aux dommages d'ADN et meurent par apoptose. Celle-ci est régulée par deux voies différentes dans les lymphocytes T. Dans les thymocytes, l'apoptose est médiée par p53, alors que dans les LT matures, l'apoptose se produit indépendamment de p53 et implique IRF1 (Strasser et al., 1994, Tamura et al., 1996). Porta et ses collaborateurs (Porta et al., 2005) ont réalisé une série d'expériences sur des lignées cellulaires cancéreuses et ont proposé un modèle selon lequel les interférons pourraient induire l'apoptose de deux manières différentes. L'IFN α induit l'expression de p53 probablement par STAT1 et PKR. P53 jouerait ainsi un rôle primordial dans l'induction de l'apoptose par l'IFN α et ceci par l'activation de ses gènes cibles pro-apoptotiques tel que Fas. L'IFN γ induirait l'apoptose par l'intermédiaire d'IRF1 indépendamment de p53.

Récemment, il a été montré que la surexpression d'IRF1 inhibe la prolifération cellulaire des cellules du cancer du sein (Kim et al., 2004) et induit l'apoptose par l'activation des caspases indépendamment de p53 (Bouker et al., 2005). L'expression ectopique d'IRF1 induit l'expression de la caspase 1 et l'augmentation de la sensibilité des cellules aux radiations ionisantes. Récemment, Une autre étude réalisée également sur les cellules du cancer du sein, a montré que IRF1 induit l'apoptose par la formation du complexe FADD/caspase 8 indépendamment du ligand (Stang et al., 2007).

V.3. Pathologies liées à IRF1

Le gène codant le suppresseur de tumeur IRF1 est localisé sur le chromosome 5. La mutation ou la délétion du gène codant pour IRF1 (Eason et al., 1999, Willman et al., 1993) peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies sanguines (Boulwood et al., 1993, Green et al., 1999, Willman et al., 1993) ou de tumeurs solides tel que le cancer du tractus gastro-intestinal (Ogasawara et al., 1996, Tamura et al., 1996). Il a été trouvé qu'un ou les deux allèles d'IRF1 peuvent être délétés chez des patients souffrant de leucémies ou du syndrome myelodysplastique (MDS) (Willman et al., 1993) présentant une translocation du 5q3& ou une délétion del5q (Boulwood et al., 1993). Chez 30% des patients MDS, le gène IRF1 peut être invalidé par un autre mécanisme surnommé *Exon skipping* (Harada et al., 1994). En effet, l'ARNm IRF1 subit une perte d'exon lors de l'épissage alternatif, qui aboutit à l'expression d'un IRF1 tronqué dépourvu du domaine de fixation à l'ADN et donc sans activité anti-oncogénique. En 1997, Kondo et ses collaborateurs ont mis en évidence un facteur nucléaire nommé nucleophosmin capable de se lier à IRF1 et d'inhiber son activité transcriptionnelle. Cette protéine est surexprimée dans des cas sévères de leucémies (Kondo et al., 1997).

PARTIE 4 : NF- κ B ET APOPTOSE : LE MODELE EBV

A. LE VIRUS D'EPSTEIN BARR

I. Historique

Le virus Epstein-Barr a été découvert en 1964 par T. Epstein et Y.M. Barr (Epstein et al., 1964). Ces chercheurs avaient détecté la présence de particules virales dans une lignée de lymphome de Burkitt africain. C'est au moment de la découverte de EBV que l'implication de ce virus dans les proliférations lymphoïdes a été évoquée. EBV fait partie de la famille des Herpesviridae. Il possède un spectre d'hôte réduit à l'homme et au singe tamarin (Henle et al., 1967, Miller et al., 1974, Pope et al., 1968). La primo infection survient après contact salivaire oropharyngé pendant l'enfance ou l'adolescence. Elle est plus souvent silencieuse, mais elle peut être symptomatique et responsable de la mononucléose infectieuse (Henle et al., 1969). Les cellules épithéliales de l'oropharynx sont classiquement le site primaire de l'infection et le lieu de la production virale de l'EBV. Par contre, des études récentes suggèrent que le site primaire d'infection de l'EBV serait les lymphocytes B présents dans les tissus lympho-épithéliaux pharyngés et non les cellules épithéliales de l'oropharynx. Suite à la production de virions, il y a infection des lymphocytes B lors de leur passage dans les tissus lympho-épithéliaux pharyngés. Dans les cellules B infectées, le virus entre en latence et immortalise la cellule hôte.

II. Le virus d'Epstein Barr

II.1. Données épidémiologiques

L'EBV est un puissant inducteur *in vitro* de l'immortalisation et de la transformation des lymphocytes B. Il permet l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL). L'EBV est reconnu comme l'agent causal de la MNI (Henle et al., 1969), et comme cité ci-dessus est associé à des pathologies tumorales épithéliales comme le CNP, aux syndromes lymphoprolifératifs des déficits immunitaires ainsi qu'à certains lymphomes, dont le lymphome de Burkitt, le lymphome hodgkinien (LH) et le lymphome T de type nasal (LT) (Middeldorp et al., 2003). Malgré ce potentiel tumoral, la fréquence de l'EBV est très élevée,

infectant plus de 95 % de la population adulte mondiale (Henle et al., 1969). Sa persistance est asymptomatique chez la majorité des sujets infectés. La persistance de l'EBV, *in vivo*, est due à un équilibre hôte/virus contrôlé par deux phénomènes majeurs. Le premier est le contrôle par le système immunitaire de l'hôte, de l'émergence de cellules transformées par l'EBV. Le deuxième consiste au détournement, par le virus, via ses protéines de latence, de certaines voies de signalisation cellulaire permettant de maintenir les cellules infectées par l'EBV dans un état d'immortalisation (dit de latence) où les gènes viraux et cellulaires sont co-régulés. La rupture d'un tel équilibre aboutit aux syndromes lymphoprolifératifs des déficits immunitaires induits par l'EBV (Rickinson & Kieff, 2001). Des travaux récents sur la persistance virale montrent comment l'EBV utilise le programme de différenciation des lymphocytes B de la réponse immune pour se maintenir dans les lymphocytes B mémoire quiescents, réservoirs de l'EBV (Thorley-Lawson et al. 2001).

II.2. Structure

Les Herpesvirus possèdent tous la même structure. Ce sont des virus à ADN linéaire, hélicoïdale, bicaténaire et entouré de protéines. Ce sont des virus enveloppés, leur enveloppe étant dérivée de la membrane cellulaire. L'enveloppe contient aussi des glycoprotéines virales. Les Herpesvirus ont également une nucléocapside composée de 162 capsomères. Le génome viral est situé à l'intérieur de cette nucléocapside. Entre la nucléocapside et l'enveloppe se trouve le tégument qui est composé de protéines virales. La Figure 43 illustre la composition et la morphologie de EBV. Les protéines majeures formant la capsid sont celles de 160, 47 et 27 kDa. Comme tous les Herpesvirus, EBV possède également d'autres protéines formant le virion. Parmi ces protéines, les plus abondantes sont les gp350/220 retrouvées dans l'enveloppe et 152 retrouvées dans le tégument.

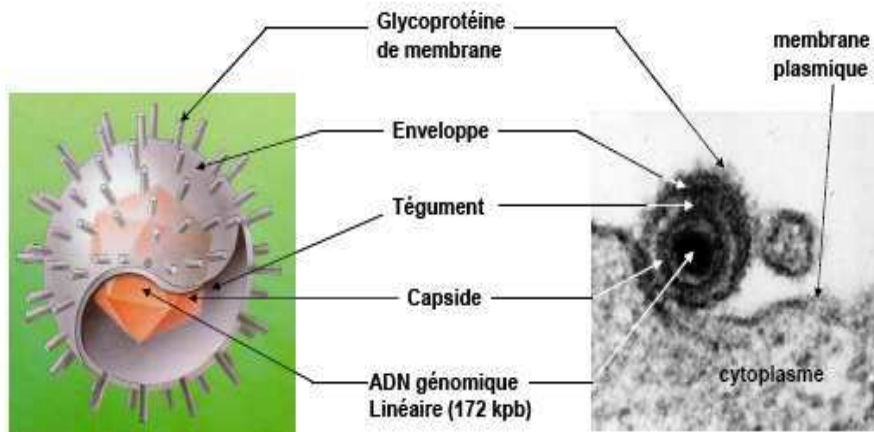


Figure 43 : Schéma et photographie de microscopie électronique. (Schéma adapté de <http://www.iwdl.net/Epstein%20Barr%20Virus.htm> et photographie obtenue sur www.bact.wisc.edu/.../ViralDisease.html, d'après Hutt-Fletcher LM, Epstein-Barr virus and immunomodulation in *Effects of Microbes on the Immune System*, 1999).

II.3. Le génome viral

Le génome de EBV a été le premier parmi tous les herpesvirus à être complètement cloné et séquencé (Baer et al., 1984). L'ADN de EBV est linéaire, double brin et comprend 172 000 pb avec un contenu en guanine/cytosine de 56%. Le génome est divisé par des domaines "uniques" (U), des domaines répétés situés dans le génome qui se nomment "internal Repeat (IR)", et des régions répétées aux extrémités du génome appelées "Terminal Repeat (TR)". Le génome de EBV code pour environ 80 protéines. La Figure 44 illustre l'organisation linéaire et circulaire du génome viral.

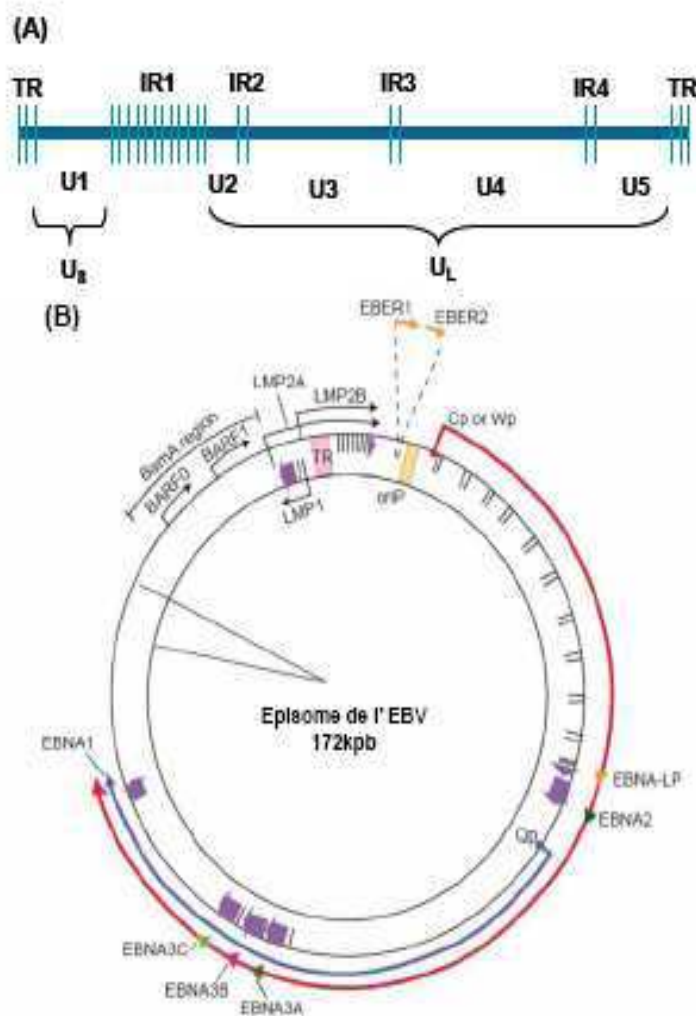


Figure 44 : Organisation du génome viral de l'EBV sous forme linéaire (A) ou épisomale (B). La forme linéaire est présente dans le virion (forme infectieuse). Dans les cellules infectées de façon latente, la fusion des séquences terminales répétées ou TRs aboutit à la circularisation du génome. IR1 à IR4 (Internal Repeat) : séquences internes répétées. U1 à U5 : séquences uniques. U_s (short Unique region), elle mesure 15 kb. U_L (long Unique region), mesure 150 kb environ (D'après (Young and Rickinson, 2004)).

II.4. Mécanisme d'infection *in vitro* des lymphocytes B par EBV

L'EBV peut infecter les lymphocytes B et les cellules épithéliales (Chang et al., 1999, Pegtel et al., 2004). Il a également des cibles dites non conventionnelles comme les lymphocytes T (Fugiwara et al., 1995, Groux et al., 1997) et les monocytes (Savard et al., 2000, Shimakage et al., 1999). Cependant la cellule B demeure la cible classique de l'EBV (Nilsson et al., 1992).

L'infection commence par la fixation du virus sur le récepteur CD21 de la cellule cible via la glycoprotéine virale gp350/220 (Fingerroth et al., 1984). Puis, il y a agrégation de molécules CD21 et internalisation du virus dans le cytoplasme par endocytose. Ensuite, l'enveloppe du virus fusionne à la membrane vésiculaire libérant la nucléocapside virale dans le cytosol. Cette étape nécessite la coopération entre la protéine gp42 et les molécules du CMH II (McShane et al., 2003). La nucléocapside est transportée jusqu'à la membrane nucléaire puis dégradée, libérant ainsi le génome viral. Celui-ci est sous forme linéaire et est transporté vers le noyau où il va se circulariser sous forme épisomale (Borza & Hutt-Fletcher, 2002, Miller & Hutt-Fletcher, 1988, Molesworth et al., 2000, Wang et al., 1998). Le virus entre en phase de latence ou en phase lytique.

Le fait que l'EBV engendre un état latent ou lytique est probablement déterminé par les facteurs de transcription de la cellule hôte. Puis très rapidement, le promoteur Wp est sollicité pour la transcription de certains gènes viraux, plus de 4h après l'infection. Ce promoteur Wp permet l'expression des protéines EBNA2 et EBNA-LP, essentielles à l'initiation de la prolifération autonome des lymphocytes B (Krauer et al., 1999, Lin et al., 2002, Wang et al., 1990). Quelques heures plus tard, EBNA3A, 3B, 3C et la protéine LMP1 sont exprimés (12h après l'infection) (Figure 45).

In vivo, la primo-infection de l'hôte se fait principalement par la salive via les cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales (Figure 46). L'infection des cellules épithéliales par l'EBV a été clairement démontrée *in vitro* (Chang et al., 1999, Speck et al., 2000, Shannon et al., 2006), cependant le fait que leur infection ait lieu précédemment ou subséquent à celle des lymphocytes B est une question très débattue dans la littérature. Deux possibilités sont proposées : (i) EBV infecte les cellules épithéliales en premier, effectue un cycle lytique qui conduit à la destruction des cellules et libération des virions qui peuvent infecter les cellules B. (ii) l'EBV infecte directement les cellules B qui affluent au niveau des muqueuses de façon indépendante des cellules épithéliales ou alors en coopération avec celles-ci. Cette deuxième hypothèse peut être soutenue par la présence de cryptes dans

l'épithélium de l'anneau de Waldeyer (Cesarman et al., 2002, Schuster & Muschen, 2003). Les lymphocytes B naïfs infectés par l'EBV se localisent directement sous l'épithélium des amygdales (Babcock et al., 2000, Babcock & Thorley-Lawson, 2000, Joseph et al., 2000).

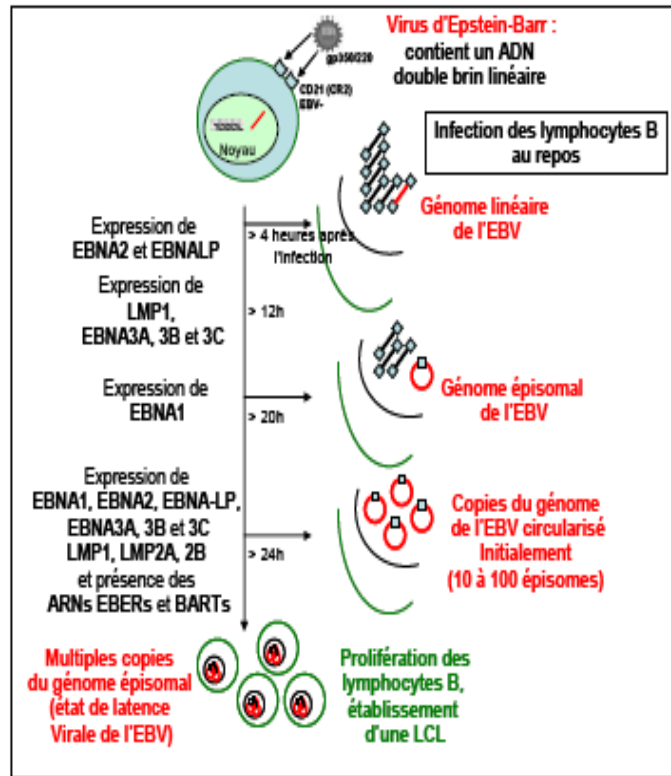


Figure 45 : Représentation schématique de l'infection, *in vitro*, par l'EBV.

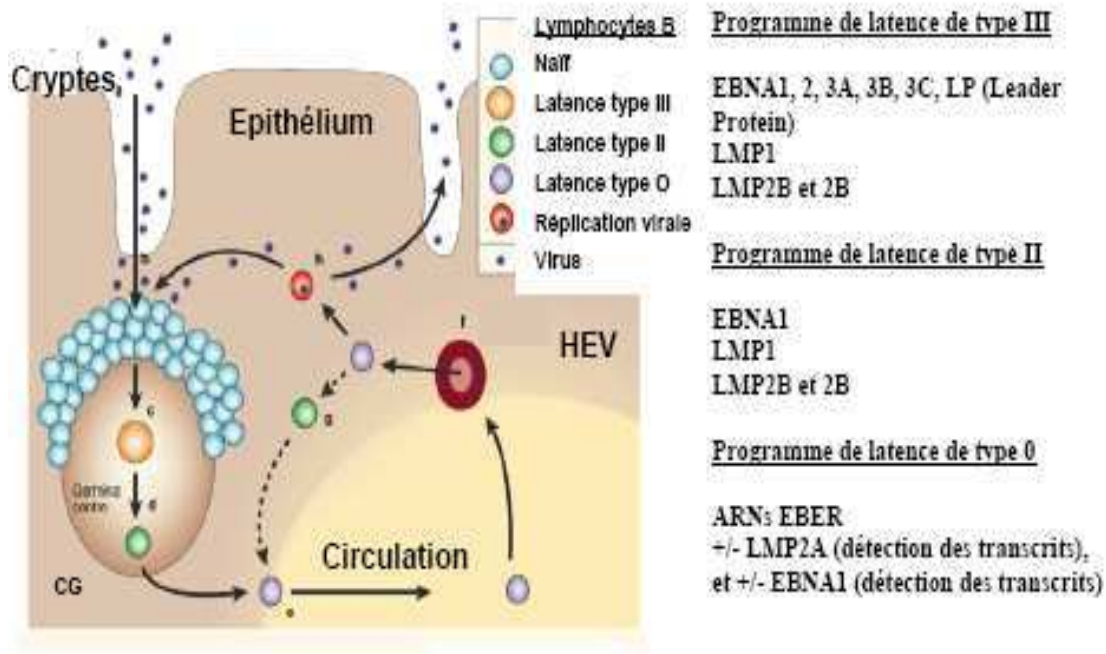


Figure 46 : Modèle d'infection par le virus d'Epstein-Barr. (a) le virus, provenant de la salive, (b) pénètre à l'intérieur des cryptes du lympho-épithélium des amygdales. (c) il infecte directement les lymphocytes B naïfs, qui sont alors des lymphoblastes dans lesquels l'EBV induit le programme de latence III par l'intermédiaire des 9 protéines de latence (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP (Leader protein); LMP1 ; LMP2A et 2B) sous la direction de EBNA2. (d) Les lymphoblastes infectés par l'EBV changent de programme d'expression des gènes viraux, et induisent la latence II où seulement 3 protéines virales sont exprimées (EBNA1, LMP1, LMP2A et -2B). Ces protéines maintiennent les signaux de survie nécessaires. (e) Les lymphocytes B mémoires/EBV+ (latence 0) quittent les follicules et entrent dans la circulation périphérique par les lymphatiques efférents. (f) Les lymphocytes B mémoires/EBV+ retournent dans l'amygdale par les veinules post-capillaires de l'endothélium épais (HEV, pour « High Endothelial Venules »), (g) leur survie nécessite l'induction du programme de latence II, puis quittent l'amygdale et retournent dans la circulation sanguine en latence 0. (h) Occasionnellement, les lymphocytes B mémoires/EBV+ peuvent induire le cycle lytique, et libérer du virus dans la salive. CG : Centre Germinatif (D'après (Thorley-Lawson et al., 2001)).

Le mécanisme d'infection des cellules épithéliales n'est pas bien compris, ces cellules n'expriment pas CD21 (Speck et al., 2000, Tugizov et al., 2003). Des travaux ont montré que l'attachement du virus aux cellules épithéliales fait intervenir la glycoprotéine virale gH (Molesworth et al., 2000). D'autres auteurs suggèrent la formation d'une synapse intercellulaire où sont concentrés des complexes gp350/CD21 (Shannon et al., 2006).

II.5. Phase de latence

L'EBV a un cycle composé de deux étapes : une phase de latence et une phase lytique ou productive. La première maintient le virus à long terme dans la cellule hôte et la deuxième permet la production de particules virales. Chez l'hôte, l'EBV est majoritairement à l'état latent. Un jeu de gènes de latence lui confère ses capacités d'immortaliser les cellules *in vivo* et *in vitro*. Parmi les 90 gènes présents dans le génome viral, 11 sont exprimés durant la phase de latence (les EBER1 et 2, EBNA-1-2-3A-3B-3C et LP, LMP-1-2A et 2B) et d'autres durant la phase lytique (gp350, BZLF-1, VCA, BXLF-1, BALF-5, BRLF-1, BCRF-1).

Une notion importante à définir est celle de latence virale, qui correspond à une interaction spécifique virus hôte, durant laquelle le génome viral persiste dans la cellule infectée. L'EBV a la particularité de présenter 4 types de latence définis en fonction de l'expression des différentes protéines de latence par l'EBV. La latence I, décrite dans le lymphome de Burkitt, est définie par la synthèse des ARN EBER et de la protéine nucléaire EBNA1. Cette protéine de liaison à l'ADN permet de maintenir le génome viral à l'état épisomal. Cet état de latence contribue à l'échappement immunitaire de l'EBV.

La latence II, observée dans le cancer du nasopharynx ou dans la maladie de Hodgkin, est définie par la synthèse de EBNA1, des EBER et des trois protéines membranaires LMP1, LMP2A et LMP2B. La latence III est définie par la synthèse de toutes les protéines de latence (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C, EBNA LP et LMP1, LMP2A, LMP2B) avec les petits ARN EBER. On retrouve ce type de latence dans les lymphoproliférations B des déficits immunitaires et lors de la primo-infection des lymphocytes B de l'amygdale. L'établissement de la latence III est associée à une immortalisation concomitante des cellules permettant l'établissement *in vitro* de lignées lymphoblastoïdes LCL qui prolifèrent indéfiniment en culture. Enfin la latence 0, où seule l'ARN LMP2a est exprimée, correspond à un état où persiste l'EBV dans les cellules infectées quiescentes, *in vivo* (Figure 46).

Dans la latence de type III appelé également programme d'immortalisation, les protéines les plus importantes sont EBNA2 et LMP1. EBNA2, produite précocement lors de l'infection virale, induit l'expression des gènes cellulaires CD21 et CD23 impliqués dans l'activation et la multiplication des cellules B ainsi que c-myc et surtout les gènes viraux de latence III, tel que LMP1 (Figure 46).

III. La protéine LMP-1 et la transformation cellulaire

III.1. La protéine LMP1

Parmi les protéines de latence de l'EBV, LMP1 joue un rôle majeur dans les processus d'immortalisation et de transformation. C'est une protéine membranaire de 386 acides aminés, constituée d'un court domaine N-terminal intra-cytoplasmique de 24 aa, de six domaines transmembranaires contenant six segments hydrophobes de 20 aa et d'un domaine C-terminal intra-cytoplasmique de 200 aa. Les domaines trans-membranaires peuvent s'oligomériser spontanément, mimant l'interaction récepteurs/ligand (ex : TNF-R/TNF-L) : LMP1 est constitutivement agrégée à la membrane plasmique sous forme de « patches » et alors directement activée (Gires et al., 1997). La protéine LMP1 est codée par le gène BNLF-1, localisé dans la séquence interne unique U5 du génome viral. Ce gène est composé de trois exons séparés par des introns. Le premier exon (310pb) code pour la partie N-terminale et les 3 premiers domaines transmembranaires. Le second exon (86pb) code pour le quatrième domaine transmembranaire. Et enfin, le troisième exon (923pb) code pour les deux derniers domaines transmembranaires et la partie C-terminale. Ce gène est sous le contrôle de deux promoteurs différents ED-L1 (BamHI EcorI D fragment located LMP1 promoter) nommé également pLMP1 (promoteur LMP1) et TR-L1 (TR-located LMP1 promoter) (Sadler et al., 1995, Sjoblom et al., 1995, Tsai et al., 1999, Zhao et al., 2000, Lin et al., 2002) (Figure 47).

EBNA2 transactive l'expression de plusieurs gènes en particulier le gène BNLF1, en interagissant avec le domaine de répression de RBP-Jκ et de la protéine SKIP (Ski Interacting Protein) (Zhou et al., 2000). Ainsi, elle lève l'inhibition et permet la transcription du gène BNLF1 à partir du promoteur ED-L1. Via son domaine d'activation, EBNA2 recrute des coactivateurs transcriptionnels p300/CBP, PCAF (Wu et al., 1996, Wang et al., 2000, Bandobashi et al., 2001). La protéine virale EBNA-LP peut également coopérer avec EBNA2 et co-activer le gène BNLF1 (Peng et al., 2005).

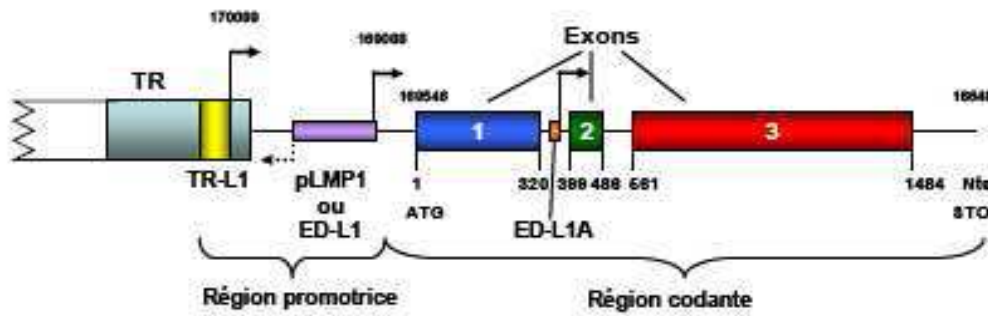
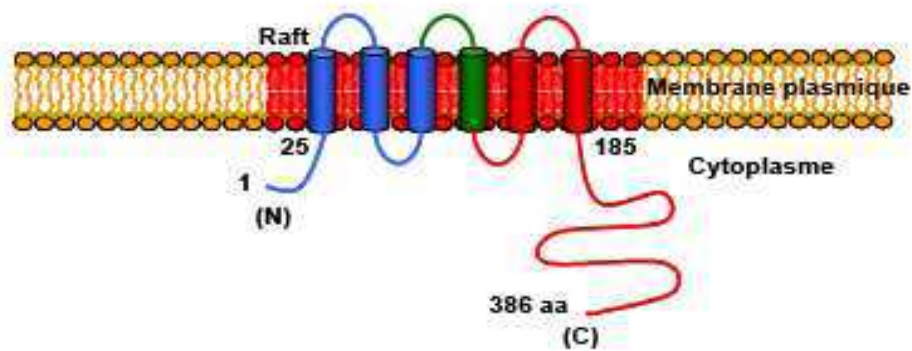
(A) Le gène BNFL1 codant LMP1**(B) La protéine LMP1**

Figure 47 : Structure du gène BNFL1 (A) et de la protéine LMP1 (B) de l'EBV.

III.2. Rôle de LMP1 dans la transformation des lymphocytes B

La protéine LMP1 possède des propriétés oncogéniques qui ont des effets sur la survie, la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la formation de métastases.

L'expression de cette protéine dans des lignées fibroblastiques de rongeurs induit toutes les modifications propres aux oncogènes telles que la perte du phénomène d'inhibition de contact, la croissance indépendante d'un ancrage et la tumorigénicité dans les souris nude (Wang et al., 1985, Baichwal et al., 1988).

Dans des lignées B dérivées de lymphomes de Burkitt EBV-, la seule expression de LMP1 s'accompagne de modifications phénotypiques comparables à celles observées lors de la transformation lymphocytaire B par l'EBV : agrégation des cellules, induction de l'expression de marqueurs d'activation, de molécules d'adhésion et de molécules anti-apoptotiques.

LMP1 induit l'expression de marqueurs cellulaires impliqués indirectement dans la transformation cellulaire tels que les molécules d'adhésion comme LFA1, LFA3 et ICAM 1 dans les lymphocytes B (Cahir-Mcfarland et al., 2004, Park et al., 2002), les marqueurs d'activation CD21, CD23 (récepteur de basse affinité des IgE), CD30, CD40, CD80 et CD83 (molécules de costimulation des lymphocytes B). L'expression de nombreuses cytokines (IL6, IL8, IL10, TNF) et facteurs de croissance (FGF2 et VEGF) est également augmentée par LMP1. Ceci permet à la cellule infectée, d'une part d'échapper au système immunitaire, et d'autre part de proliférer de façon autocrine ou paracrine (Mosialos et al., 2001, Wakisaka et al., 2002, Nakayama et al., 2004, Stevenson et al., 2005, Uchihara et al., 2005, Vockerodt et al., 2005, Okudaira et al., 2006). LMP1 inhibe également certaines molécules d'adhésion comme la E-cadhérine dans les cellules épithéliales (Tsai et al., 2002).

Des souris transgéniques exprimant LMP1 sous la dépendance d'un promoteur B développent des lymphomes (Kulwichit et al., 1998). Par la création de virus EBV recombinants spécifiquement mutés pour LMP1, il a été montré que cette protéine, et en particulier sa portion C-terminale, joue un rôle indispensable dans la transformation cellulaire B par l'EBV (Kaye et al., 1993). Cette portion carboxy-terminale possède deux domaines, appelés CTAR1 (C-terminal activating region 1) ou TES1 (transformation effector site 1) et CTAR2 ou TES2, impliqués dans la fonction activatrice et transformante de LMP1. L'identification des protéines effectrices se liant à ces deux domaines a mis en évidence des homologies de fonction avec les TNFR, et montré que LMP1 se comporte comme un TNFR activé de façon

constitutive. En effet, CTAR1/TES1 contient un site de fixation des TRAFs (« Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor »), molécules adaptatrices impliquées dans la transduction de signal par les TNFR (Mosialos et al., 1995, Devergne et al., 1996). Le deuxième domaine, CTAR2/TES2, lie directement d'autres molécules également impliquées dans la transduction de signal par les TNFR, les molécules TRADD et RIP (Izumi et al., 1997, Izumi et al., 1999). Via ces interactions, LMP1 active les voies NF- κ B et c-jun N-terminal kinase (JNK)/AP1. L'activation de NF- κ B est essentielle à la survie des lignées transformées par l'EBV (Cahir-McFarland et al., 2000). Une étude a suggéré que LMP1 activerait également la voie JAK-STAT par interaction avec JAK3 (Gires et al., 1999). Toutefois, cette interaction n'a pas été observée par d'autres (Higuchi et al., 2002) et ne joue pas de rôle essentiel dans la transformation (Izumi et al., 1999). La voie p38/MAPK, médiateur de l'induction de cytokines par l'intermédiaire de kinases, est également induite par LMP1, par l'intermédiaire de TRAF6 (Shirakata et al., 2001).

LMP1 détourne donc les molécules de signalisation TRAF/TRADD des TNF-R impliquées dans la signalisation des TNF-R (CD30, CD40 et CD95), ayant pour effet l'activation des voies de signalisation NF- κ B, p38/MAPK et JNK1/AP1, et pour résultat de protéger les cellules de l'apoptose et d'augmenter leur prolifération (Figure 48).

Un des membres TNF-R, le CD40, est présent dans différents types cellulaires et joue un rôle important dans la régulation de la réponse immune. Comme LMP1, l'interaction avec son ligand (CD40-L) sous forme trimérique, génère un signal médié par les TRAF activant différentes protéines kinases et les voies de signalisation. Cette molécule peut également conduire à l'induction de l'expression de FAS et provoquer l'entrée des cellules en apoptose (Lens et al., 1996) (par exemple l'inhibition de la prolifération de lymphomes diffus à cellules B).

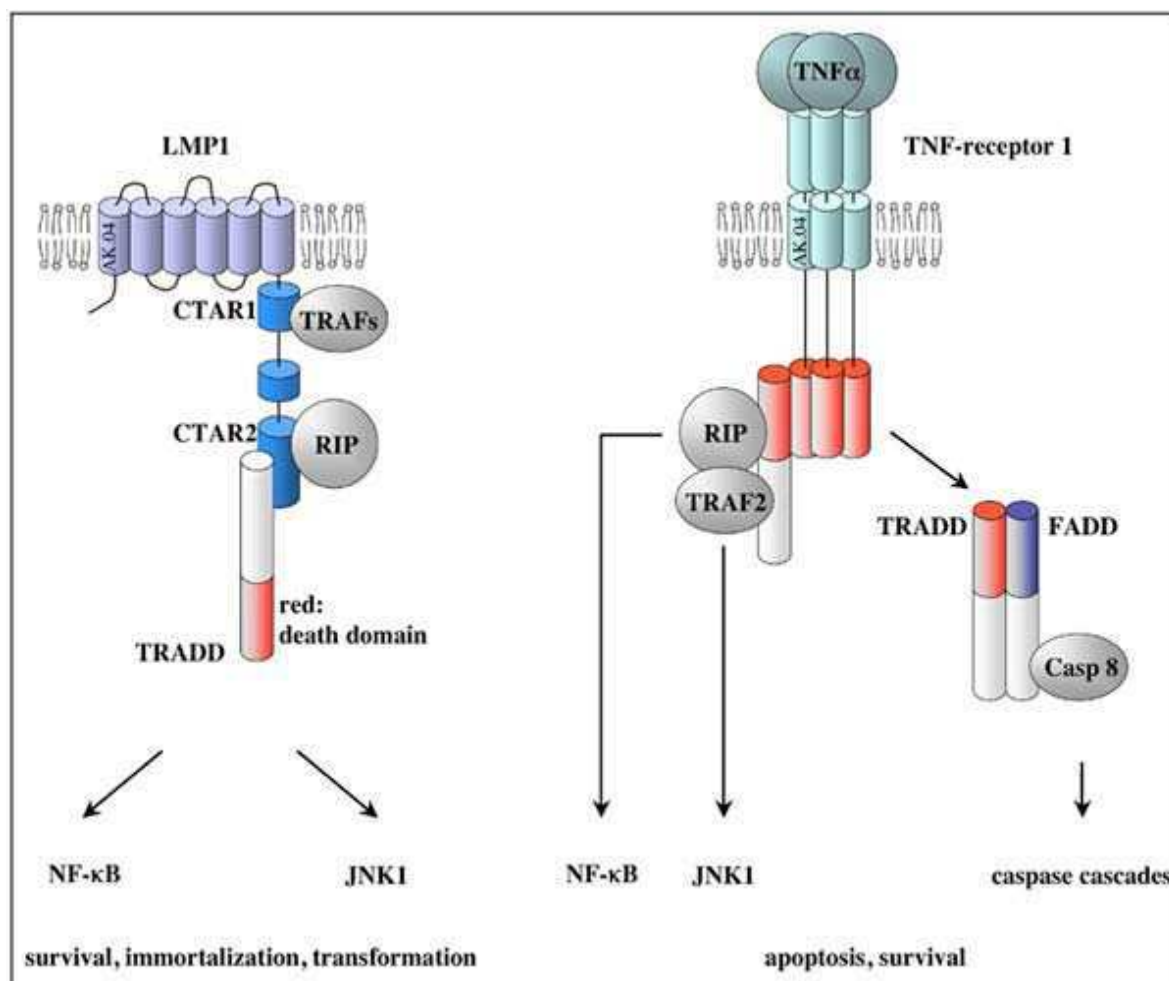


Figure 48 : Voies de signalisation de LMP1 et du TNFR.

Une des fonctions de LMP1 contribuant à son oncogénicité est la suppression de l'apoptose. L'activation de la voie NF-κB semble être très importante pour l'inhibition de l'apoptose. LMP1 peut inhiber l'apoptose en augmentant l'expression de l'oncogène BCL2 et probablement par l'induction de A20, un autre gène anti-apoptotique (Fries et al., 1996).

Plusieurs études se sont intéressées à l'étude des voies mises en œuvre par LMP1 pour la régulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Il a été montré que c'est le niveau d'expression de LMP1 qui détermine le choix entre les deux processus. Ainsi, entre 2×10^5 et 4×10^5 molécules par cellule, LMP1 favorise l'apoptose (Sandberg et al., 2000). A des concentrations inférieures, LMP1 a un effet prolifératif (Kaykas et al., 2000).

B. LA VOIE DE TRANSDUCTION DU SIGNAL NF- κ B

I. La voie NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) est présent dans le cytoplasme de nombreuses cellules. Il intervient dans de nombreux processus cellulaires comme l'inflammation, la réponse immunitaire, l'adhésion, la croissance cellulaire et l'apoptose. Le rôle de NF- κ B dans l'induction de la survie cellulaire et la protection de l'apoptose a été découvert tardivement en comparaison avec la connaissance de son importance dans l'immunité et l'inflammation.

I.1. Membres de la famille NF- κ B

La famille NF- κ B inclut 5 membres RelA/p65, RelB, NF- κ B/p50, NF- κ B2/p52 et c-Rel, capables de former des homo ou hétérodimères comme p50-p50, p52-p65 et p50-p65 (Paine et al., 1995, Eliopoulos et al., 1996). Les protéines c-Rel, RelB et p65/RelA sont synthétisées sous leur forme fonctionnelle et contiennent toutes un domaine d'activation de la transcription (TD en C-terminal). A l'opposé, p50 et p52 résultent du clivage protéolytique de leurs précurseurs respectifs p105 et p100. Tous ces membres possèdent un domaine très conservé d'environ 300 aa, appelé « Rel Homology Domain » (RHD) permettant la fixation à l'ADN, la dimérisation des sous-unités, la localisation nucléaire et la liaison à la protéine inhibitrice I κ B (Inhibitor of NF- κ B) (Moynagh et al., 2005). Les protéines kinase inhibitrices I κ B (Inhibitor of NF- κ B) incluant 3 isoformes : I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ , se fixent aux complexes NF- κ B par des motifs "Ankyrin repeats" empêchant ainsi leur translocation nucléaire et par conséquent leur activité transcriptionnelle (Figure 49).

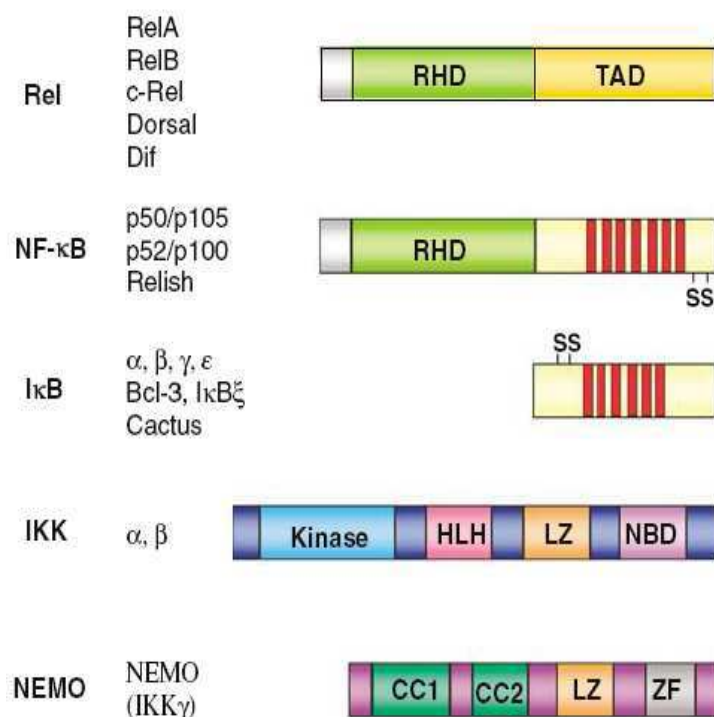


Figure 49 : Structure et domaines fonctionnels de la famille Rel/NF-κB et leur homologues chez la drosophile.

RHD: Rel Homology Domain ;
 N: Nuclear localisation signal ;
 TAD : Transactivation Domain ;
 LZ : Leucine Zipper ;
 GRR : Glycine Rich Region ;
 NBD: NEMO Binding Domain
 ANK : ANKyrin repeats
 (D'après (TD Gilmore 2006).

I.2. Activation de NF-κB

La voie NF-κB peut être activée par différents stimuli tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1) des toxines bactériennes (LPS, exotoxine B), des produits de gènes viraux (LMP1) ou par différents stress cellulaires (radicaux libres, UV, radiations gamma, drogues). L'activité de NF-κB est régulée par des phénomènes d'interactions protéine-protéine, de phosphorylation-déphosphorylation, de changements de conformations tertiaires. La régulation la plus étudiée, essentielle à l'activation de NF-κB, est celle assurée par les protéines inhibitrices de la famille IκB. NF-κB agit comme facteur de transcription sous forme de dimère. Les dimères peuvent être constitués de différentes sous-unités p50, p52, c-Rel, RelB, p65 (RelA) mais le dimère le plus fréquent est constitué de p50/p65 (Baldwin et al., 1996). Dans les cellules non stimulées, NF-κB est conservé sous forme inactive dans le cytoplasme par interaction avec des protéines inhibitrices de la famille I-κB. (Baldwin et al., 1996).

NF- κ B peut être activé par deux voies distinctes : une voie canonique et une voie non canonique (Figure 50). Elles diffèrent de part la dégradation de I κ B α , la maturation de p100 et la nature des stimuli. Ainsi, des stimuli tels que le TNF α ou l'IL1 induisent la voie classique ou canonique, tandis que les récepteurs de la superfamille des TNFR tels que BAFF-R, le récepteur de la lymphotoxine B et le CD40 activent la voie non canonique.

La voie canonique

Cette voie est caractérisée par l'activation du complexe IKK α /IKK β /IKK γ qui phosphoryle deux résidus sérines 32 et 36 d'I κ B situés en N-terminal (Brown et al., 2003). Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination du résidu lysine 48 d'I κ B α aboutissant à sa dégradation dans le protéasome et donc à la libération du dimère p50/p65.

La voie non canonique

Cette voie ne nécessite que la kinase IKK α capable de cibler les complexes NF- κ B composés des sous-unités NF- κ B/p100. La kinase NIK (NF- κ B Inducing Kinase) active la kinase IKK α qui à son tour phosphoryle deux sérines présentes dans la partie « Ankyrin repeats » de l'extrémité C-terminale de p100. Ensuite, p100 est ubiquitinylée provoquant sa dégradation partielle, puisque seule la partie « Ankyrin repeats » est dégradée, la transformant ainsi en p52.

L'homodimère ou l'hétérodimère NF- κ B est transloqué dans le noyau et se fixe aux sites kappaB présents dans les promoteurs des gènes cibles de NF- κ B, permettant ainsi la transcription des gènes cibles (Karin et al., 2002, Pahl et al., 1999). La fixation de NF- κ B sur ces motifs kB situés sur l'ADN fait intervenir d'autres facteurs qui vont s'associer à l'ADN et interagir avec NF- κ B comme ceux appartenant à la machinerie transcriptionnelle (TBP, TFIIB ou p300/CBP) ou des corépresseurs (Campbell et al., 2004, Moynagh et al., 2005).

NF- κ B peut agir en synergie avec d'autres facteurs de transcription tels que c-Jun ou sp-1, suggérant que la régulation différentielle de l'expression des gènes cibles de NF- κ B proviendrait d'une combinaison de sites de fixation différents avec des facteurs de transcription différents. Le complexe de protéines kinases IKK (I- κ B Kinase) qui phosphoryle I- κ B α contient deux sous-unités catalytiques qui sont des sérine kinases spécifiques d'I- κ B, IKK α et IKK β , et une sous-unité régulatrice NEMO (NF- κ B Essential Modulator) ou IKK γ

(Karin et al., 2002). Ainsi, des mutants I- κ B résistants à la dégradation par le protéasome empêchent l'action anti-apoptotique de NF- κ B et augmentent donc l'apoptose lorsqu'elle est induite par le TNF- α , la Daunorubicine ou les radiations ionisantes (Wang et al., 1996).

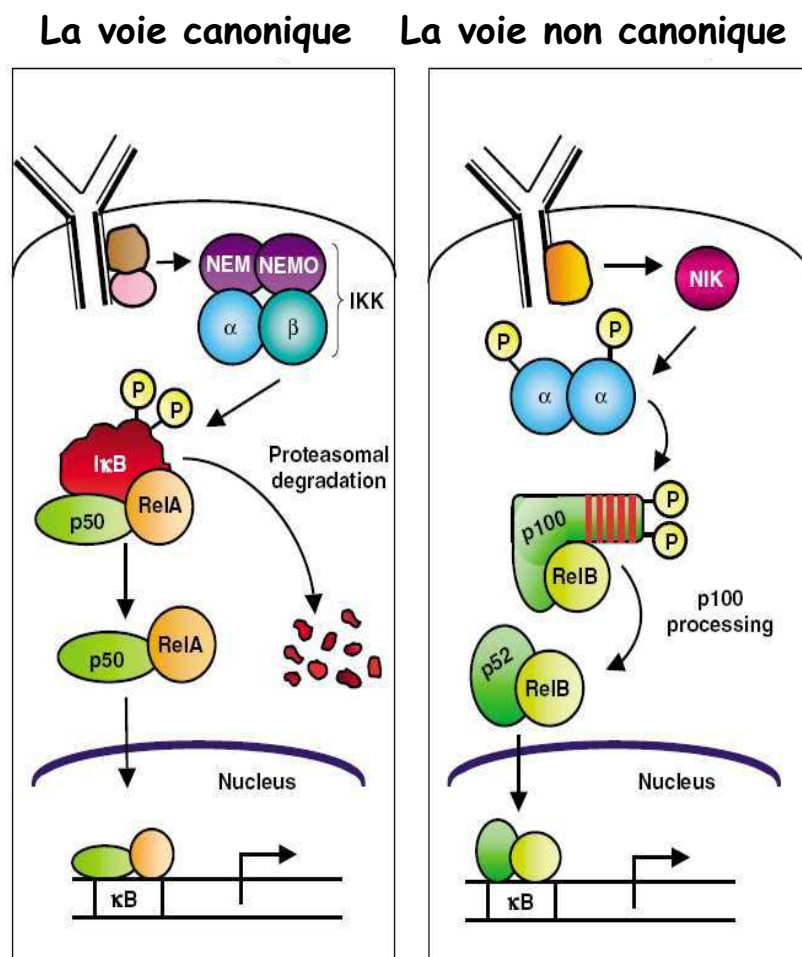


Figure 50 : Voie canonique et voie non canonique d'activation de NF- κ B (D'après (Gilmore et al., 2006)).

L'inactivation de NF- κ B due à sa protéolyse par des caspases entraîne une suppression de son rôle antiapoptotique. L'équipe de Ravi, a pu observer que l'apoptose des cellules Jurkat induite par Fas, est accompagnée d'un clivage protéolytique des protéines p50 et p65 qui dépend de l'activité de la caspase 3. La protéine c-Rel possède trois sites de coupure par la caspase 3. Par ailleurs, I κ B α est aussi un substrat des caspases. Une fois clivée, la protéine I κ B α devient une forme naturelle de super-répresseur de NF- κ B.

II. Rôles de NF- κ B

NF- κ B est impliqué dans les processus de réponse inflammatoire, de réponse immunitaire innée et acquise, d'adhésion cellulaire, de contrôle du cycle cellulaire et de protection contre l'apoptose. C'est un médiateur clé de l'induction de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Barkett & Gilmore, 1999).

II.1. NF- κ B et l'apoptose versus prolifération cellulaire

NF- κ B a été décrit comme un inhibiteur de l'apoptose principalement induite par le TNF α (Baldwin et al., 1996) qui peut activer à la fois la voie NF- κ B et une voie apoptotique, dépendante de la caspase-8. La fonction pro-proliférative de NF- κ B a été identifiée par invalidation d'un gène codant une des protéines de la voie NF- κ B, RelA, et confirmée plus tard en invalidant d'autres composants, tels qu'IKK-2 ou NEMO. Les souris correspondantes présentent une létalité embryonnaire due à une apoptose massive du foie. Ce processus apoptotique était dû à une résistance diminuée des cellules au TNF. De plus, il a été montré qu'IKK était indispensable pour la survie cellulaire (Li et al., 1999). Les gènes codant pour les IAP (c-IAP1, c-IAP, et XIAP), pour FLAP, TRAF-1 et TRAF-2 et pour des homologues de BCL-2 sont des gènes anti-apoptotiques directement activés par NF- κ B. En activant les IAP, NF- κ B empêche l'activation des caspases mais il peut aussi induire l'expression de membres de la famille BCL-2 comme BCL-X_L qui est anti-apoptotique ou inhiber l'expression de BAX pro-apoptotique (Bentires-Alj et al., 2001). NF- κ B est également fortement activé dans certains cancers (cancers du sein, des ovaires, de la prostate, du côlon) ainsi que dans l'initiation de l'apoptose des neurones dans la maladie d'Alzheimer (Yamamoto & Gaynor, 2001).

Plusieurs études ont montré que l'absence de NEMO, IKK1 et de IKK2 inhibe complètement la réponse cellulaire à la Doxorubicine, l'Etoposide ou à l'irradiation. D'autres activateurs de NF- κ B ont été identifiés comme la sérine/thréonine kinase RIP contenant un domaine DED et les membres de la famille TRAF qui médient la réponse cellulaire induite par quelques récepteurs du TNF (TNF-R1, TNF-R2, CD95).

Au cours du cycle cellulaire, l'activité de NF- κ B est augmentée dans la transition G0/G1. NF- κ B induit l'expression de la cycline D1 et de la cycline A (par un mécanisme encore inconnu)

qui est un régulateur essentiel du passage G1/S (Guttridge et al., 1999, Joyce et al., 2001, Karin et al., 2002). Par conséquent, l'inhibition de NF- κ B entraîne un retard ou un arrêt de la progression des cellules dans le cycle. NF- κ B/c-Rel s'associe au complexe cycline E/Cdk2 intervenant dans la transition G1/S. Cependant, le rôle de cette association avec NF- κ B dans la régulation de l'activité de Cdk2 n'a pas été élucidé.

Bien qu'exerçant essentiellement des fonctions d'induction de la survie, quelques études ont démontré l'implication de NF- κ B en tant que médiateur de l'apoptose. L'activation de NF- κ B par des agents de chimiothérapie ou des signaux d'activation des cellules T, induit l'apoptose en transactivant les gènes codant pour le récepteur de mort Fas (APO-1, CD95) ou son ligand (FasL). Une induction de c-myc et de p53 par NF- κ B a également été rapportée (Joyce et al., 2001). Ryan et ses collaborateurs ont montré que l'activation de NF- κ B était essentielle pour l'induction de l'apoptose par p53 (Ryan et al., 2000). En effet, l'inhibition de l'activité de NF- κ B est corrélée à une absence d'apoptose normalement induite par p53. L'accumulation de la protéine p53 dans le noyau est due à une augmentation de sa stabilité et à une induction de son expression. L'augmentation d'expression de p53 est partiellement régulée par NF- κ B lors d'un traitement par la daunorubicine puisqu'une inhibition de NF- κ B diminue la transcription de p53 mais ne la bloque pas totalement (Hellin et al., 2000).

NF- κ B peut aussi intervenir dans les mécanismes apoptotiques en interagissant avec d'autres protéines indépendamment de sa fonction de facteur de transcription. Le meilleur exemple reste l'interaction avec le coactivateur transcriptionnel p300/ CBP. NF- κ B et p53 sont tous les deux activés via des événements post-traductionnels en réponse à des traitements génotoxiques comme une irradiation ou une exposition à des substances cytotoxiques. Or, les actions de NF- κ B et de p53 sont le plus souvent antagonistes dans la mise en place de l'apoptose. D'ailleurs, il a été montré que p53 et NF- κ B sont en compétition pour interagir avec p300/CBP disponibles dans le noyau.

II.2. Le processus inflammatoire et immunitaire

NF- κ B est un acteur majeur dans le processus inflammatoire contrôlant l'expression d'un grand nombre de molécules qui directement ou indirectement participent à ce processus (IL-1, IL-8, TNF, etc.). La participation de NF- κ B au processus de réponse immunitaire s'exerce à deux niveaux distincts mais intimement liés. Dans l'immunité innée, NF- κ B est activé en aval des TLRs (Toll Like Receptors). Dans l'immunité acquise, NF- κ B est activé par le TCR ce

qui favorise la prolifération des lymphocytes T. Le mode d'activation de NF- κ B par le TCR restait mal caractérisé.

III. Relation entre NF- κ B et la protéine virale LMP1

Il est bien établi que NF- κ B joue un rôle important dans l'expression des gènes induits par LMP1. L'inhibition de NF- κ B dans les LCL aboutit à la mort des cellules par apoptose (Asso-Bonnet et al., 1998, Cahir-McFarland et al., 1999). L'activation de cette voie est associée à l'immortalisation induite par LMP1 des lymphocytes B humains (Devergne et al., 1996, Izumi et al., 1997, Cahir-McFarland et al., 1999). Le domaine CTAR1 de LMP1 est responsable de 20 à 30% de l'activation de NF- κ B, alors que CTAR2 y contribue pour 70 à 80% (Huen et al., 1995, Mitchell et al., 1995, Eliopoulos et al., 1998, Eliopoulos et al., 1999). L'activation de la voie NF- κ B non canonique dans les lignées cellulaires de fibroblastes (Saito et al., 2003), dans les cellules épithéliales et les lymphocytes B (Atkinson et al., 2003, Luftig et al., 2004) est médiée par la région CTAR1 de LMP1. La voie canonique est médiée par la région CTAR2 de LMP1 (Atkinson et al., 2003, Saito et al., 2003, Luftig et al., 2004). Selon ces études, suite à l'oligomérisation de LMP1 dans les rafts, le domaine CTAR1 recrute directement TRAF2 ou TRAF3 qui vont recruter à leur tour la kinase NIK. Celle-ci va ensuite activer IKK α ce qui aboutit à l'activation de NF- κ B. De façon parallèle, le recrutement de TRADD et de RIP sur le domaine CTAR2 de LMP1 va induire le recrutement de TRAF6. Celui-ci va d'une part, recruter et activer par l'intermédiaire de Ubc13 et Uev1A, la complexe TAB1/RAB2/Tak1 qui va activer le complexe IKK α /IKK β /IKK γ de la voie canonique. D'autre part, il y a activation de IRAK1 qui induit la phosphorylation de p65/RelA soit directement ou indirectement. Dans cette voie, TRAF2 permet la formation d'un complexe catalytique composé des protéines NIK, IKK, I κ Bs et la sérine-thréonine kinase Tp1-2/Cot (Eliopoulos et al., 2002).

La présence de Tp1-2/Cot dans ce complexe est nécessaire à l'activation de NF- κ B par LMP1. Cette kinase peut contrôler la phosphorylation des protéines I κ B et p100. Par ailleurs, elle peut également augmenter l'activation de IKK et NIK (Lin 1999). Une équipe a très récemment confirmé que TRADD est bien nécessaire et requis pour induire la voie NF- κ B via CTAR2 (Neugebauer et al., 2006). Ces travaux réalisés sur des cellules B TRADD $^{-/-}$ ont permis de montrer que l'activation d'IKK β induite par le domaine CTAR2 de LMP1 est bien dépendante de TRADD. TRADD est donc bien exigé pour le recrutement d'IKK β à LMP1 et

est donc requis pour l'induction de la voie canonique de NF- κ B, au moins dans les lymphocytes B.

TRADD est également capable d'activer NF- κ B dans la voie de signalisation du TNFR1 par une interaction physique avec l'effecteur secondaire, TRAF2 (Hsu et al., 1996). Le domaine CTAR2 de LMP1 peut activer la voie NF- κ B par un mode semblable. En fait, l'engagement constitutif entre LMP1 et TRADD active les signalisations NF- κ B et p38/MAPK, activation partiellement inhibée par un mutant dominant négatif de TRAF2 (Izumi & Kieff 1997, Eliopoulos et al., 1999). Ainsi, TRAF2 est un composant important de ces deux voies de signalisation.

LMP1 utilise la voie NF- κ B pour réguler positivement l'expression de plusieurs gènes anti-apoptotiques tels que A20, TRAF1, l'inhibiteur des caspases c-IAP (Gregory et al., 1991). Récemment, il a été montré que LMP1 peut réprimer l'expression du gène pro-apoptotique BAX via la voie la voie NF- κ B (Grimm et al., 2005). Par l'activation de NF- κ B, LMP1 peut réguler les protéines Id1 (inhibitor of differentiation) et Id3 dont le rôle est d'inhiber l'expression de certains inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p16 INK4a (Everly et al., 2004).

IV. NF- κ B et oncogénèse

Une dérégulation de la voie NF- κ B peut concourir au processus de tumorigénèse. NF- κ B est constitutivement actif dans plusieurs cancers tels que le cancer du sein et le lymphome d'Hodgkin.

En relation avec le cancer, NF- κ B joue également un rôle clé dans la protection contre l'apoptose. L'acquisition d'une résistance à l'apoptose par les cellules cancéreuses est une étape nécessaire au processus de cancérisation. Il a été très souvent observé que cette résistance est associée à une activation constitutive de NF- κ B (Greten et al., 2004). En effet, l'inhibition de l'activité NF- κ B par la surexpression du dominant négatif I κ B α (muté au niveau des sérines 32 et 36) en absence ou en présence d'un stimulus pro-apoptotique comme le TNF, se traduit par une mortalité cellulaire (Hinz et al., 2001, Davis et al., 2001). De ce fait, le rôle anti-apoptotique de NF- κ B peut se révéler problématique quand des traitements anti-cancéreux tels que la chimiothérapie sont envisagés, surtout que la plupart des approches

thérapeutiques : agents cytotoxiques tels que la Daunorubicine, ou les radiations ionisantes sont eux-mêmes des activateurs de NF- κ B. Par ailleurs, la combinatoire de l'inhibition de NF- κ B et du traitement chimiothérapeutique est plus efficace en terme de thérapie (Wang et al., 1996).

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Notre équipe s'intéresse à l'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV. Ce phénomène implique la mise en jeu et le détournement de facteurs transcriptionnels cellulaires. Notamment, la protéine latente, LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV, est connue pour activer de manière constitutive différents facteurs de transcription dont NF- κ B, STAT1 et p53 (Gires et al., 1999, Higuchi et al., 2002, Najjar 2005).

Objectifs

Ainsi, mon objectif de thèse a consisté à étudier dans un premier temps la relation entre p53 et STAT1 dans le modèle EBV, puis, de façon plus générale en réponse à un stress génotoxique et de comprendre le rôle de p53 dans l'activation de STAT1 au plan fonctionnel et structurel et enfin de déterminer le mécanisme exact de la régulation de STAT1.

Travaux réalisés

Nous avons défini des outils moléculaires permettant de moduler l'activité des cibles cellulaires de l'EBV : p53 et STAT1, établi les modèles cellulaires en rapport avec les vecteurs d'expression eucaryotes inductibles codant pour ces facteurs, puis étudié au plan fonctionnel les relations entre cibles transcriptionnelles du virus et la prolifération cellulaire, l'apoptose ou la différenciation des lymphocytes B, ainsi que d'étudier le transcriptome de ces facteurs cellulaires et leur rôle dans la régulation des gènes cibles identifiés. Les résultats obtenus nous ont permis d'appréhender la combinatoire des facteurs transcriptionnels NF- κ B, STAT1 et p53 dans un contexte d'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV et nous ont conduit à nous focaliser sur les interactions entre p53 et STAT1.

Dans une première étude, présentée dans l'article 1, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle du facteur de transcription STAT1 dans le contexte EBV et son interaction avec NF- κ B. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'EA 3406 de l'université de Paris XIII. Cette étude a montré que, dans les lymphocytes B infectés par l'EBV (LCL), l'activation constitutive de NF- κ B par la protéine virale LMP1 induit l'activation de STAT1 via une boucle autocrine de sécrétion des interférons (Najjar et al., 2003).

La deuxième étude, correspondant à l'article 2, a porté sur l'étude de la relation entre le virus d'Epstein Barr et les facteurs de transcription NF- κ B, p53 et STAT1 dans la régulation de la prolifération cellulaire des lymphocytes B. Nous avons étudié plus particulièrement la régulation de l'expression du facteur pro-apoptotique Fas par LMP1 et la contribution de NF- κ B, p53 et STAT1. Le gène codant pour Fas a été choisi parce que d'une part son expression dans les cellules EBV+ est mal comprise et d'autre part son promoteur peut intégrer des signaux de survie tels que NF- κ B ainsi que des signaux de mort tels que STAT1 et p53 (Behrmann et al., 1994, Muller et al., 1998).

Dans cette étude, nous montrons que l'expression de Fas est induite par LMP1 via les facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et p53. L'induction de l'expression de Fas sensibilise les cellules à l'apoptose. Ceci suggère que le programme de latence de type III de l'EBV sensibilise les lymphocytes B infectés par l'EBV à l'apoptose médiée par le récepteur Fas. Du point de vue physiologique, ce processus permettrait aux cellules B infectées par l'EBV en latence III d'être éliminées par le système immunitaire de l'hôte.

Enfin, dans le troisième article, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de p53 dans l'activation de STAT1 au plan fonctionnel et structurel et à déterminer le mécanisme exact de la régulation de STAT1 par les agents chimiothérapeutiques tels que la Fludarabine* et la Doxorubicine. A l'issue de cette étude, nous avons montré que l'activation de STAT1 par les agents chimiothérapeutiques Fludarabine, Doxorubicine et Cisplatine dépend de la présence de la protéine p53. Des expériences de régulation négative de p53 ainsi que la restauration de l'expression de p53 dans la lignée p53 null HL60 nous ont permis de confirmer le rôle de p53 dans l'activation de STAT1. Nous avons également mis en évidence un complexe protéique p53/STAT1/c-Abl. Ces données suggèrent que l'activation de STAT1 par les agents génotoxiques correspond à un nouveau mécanisme qui, d'une part dépend de la présence d'une protéine p53 indépendamment de son activité transcriptionnelle, et d'autre part implique l'activation de la tyrosine kinase c-Abl. Cette étude permettra de comprendre le rôle des facteurs protéiques p53 et STAT1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de

l'apoptose en réponse à un traitement chimiothérapeutique afin de prévoir certaines résistances aux chimiothérapies.

Avant de vous présenter les articles 1 et 2, nous allons vous exposer les outils moléculaires et cellulaires utilisés :

Les outils cellulaires :

Nous avons utilisé des lignées cellulaires différentes : les lignées du lymphome de Burkitt infectées ou non par le virus d'Epstein Barr (BL2 et BL2+), la lignée PRI qui est une lignée lymphoblastoïde (LCL) immortalisée par le virus d'Epstein Barr et en latence III. Enfin, la lignée EREB qui est une lignée lymphoblastoïde particulière qui a été établie dans le laboratoire du Pr. Georg Bornkamm (Gordadz et al., 2001). Elle est caractérisée par la présence d'une protéine chimérique EBNA2-recepteur d'oestradiol dont l'expression est induite par l'oestrogène dans le milieu de culture (Figure 51). Ainsi la cellule passe en état de latence III.

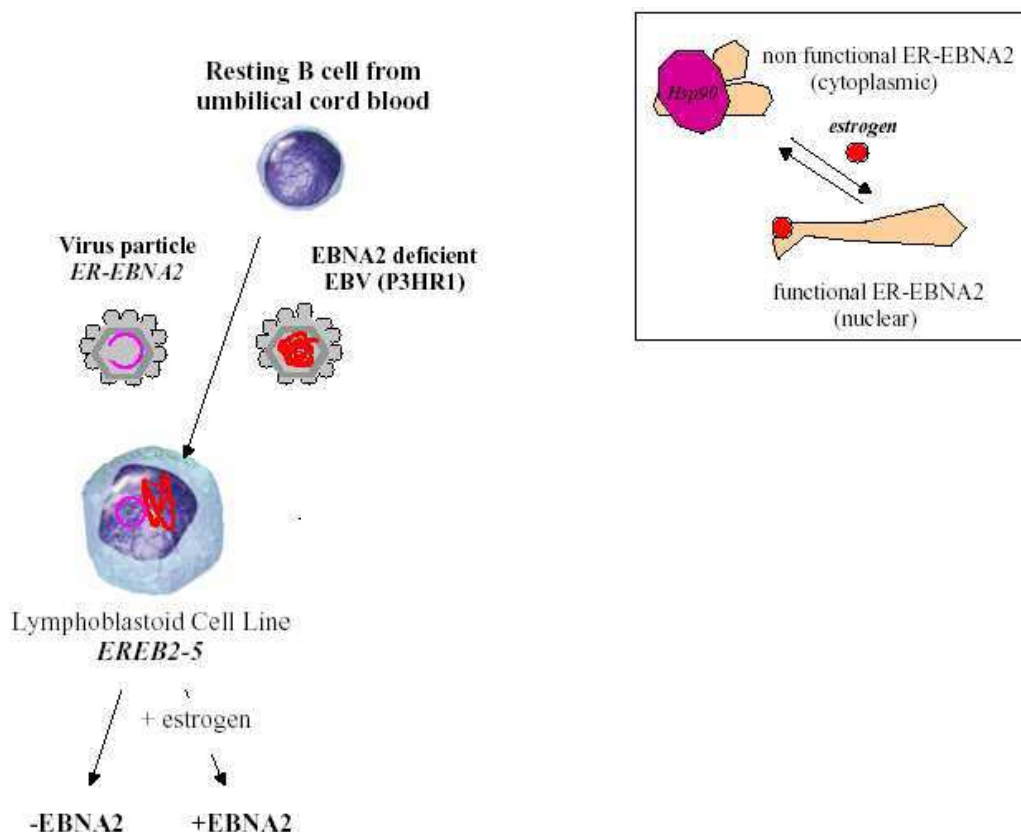


Figure 51 : Protocole d'obtention de la lignée EREB2-5 (D'après Georg Bornkamm).

Les outils moléculaires : Les vecteurs inductibles :

Nous avons utilisé une série d'ADNc codants pour I- κ B (le régulateur négatif de NF-kappaB), l'isoforme actif de STAT1 (STAT1 α), l'isoforme inactif de STAT1 (STAT1 β), la protéine sauvage p53wt, la protéine virale LMP1 et un dominant négatif de LMP1 (LMP1ct). Ces ADNc ont été clonés dans le site SfiI du vecteur pRT1. Il s'agit d'un vecteur d'expression particulier dit épisomal grâce à sa capacité de rester sous forme circulaire épisomale dans le noyau (Bornkamm et al., 2005). Il est caractérisé par (Figure 52):

-une origine de réplication plasmidique OriP d'origine virale (EBV) et le gène codant pour la protéine EBNA1 d'une façon constitutive. Ces deux séquences confèrent une stabilité au vecteur et lui permettent de rester sous forme circulaire sans s'intégrer au génome.

-Un promoteur bidirectionnelle TetO7 qui permet la transcription simultanée et dans les mêmes quantités d'une part du marqueur d'inductibilité NGFR ou GFP codé par le cDNA correspondant et d'autre part de la protéine d'intérêt codée par l'un des cDNA cités ci-dessus. Ce promoteur est activé par le facteur rtTA codé par la séquence rtTA dont l'activation est déclenchée par l'antibiotique Doxycycline, appelé également Vibramycine.

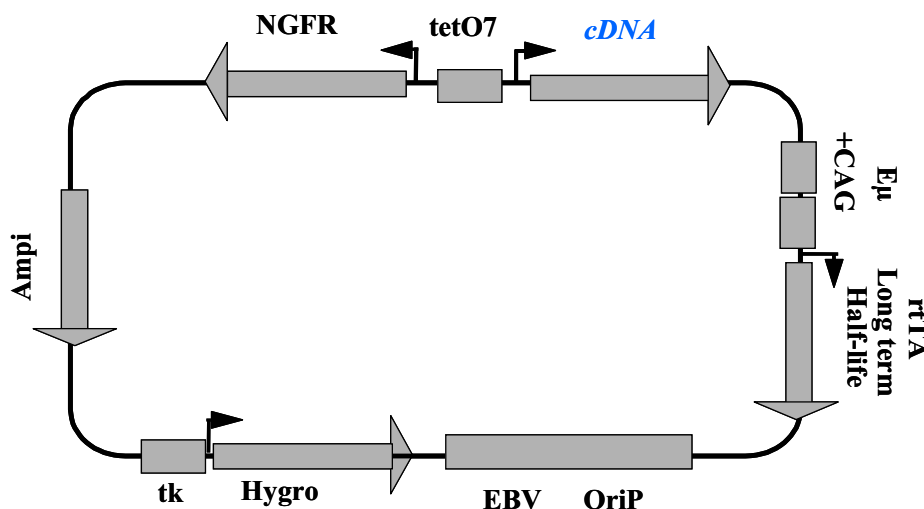


Figure 52 : Schéma du vecteur d'expression pRT-1.

L'intérêt d'avoir un marqueur d'inductibilité est de pouvoir discriminer les cellules transfectées par rapport aux cellules non transfectées et également de pouvoir trier les cellules dans le but de faire les expériences sur des cellules « pures ».

Article N°1

Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-KappaB-dependent interferon secretion in epstein-barr virus-immortalised b cells.

Najjar I, Baran-Marszak F, Le Cloennec C, Laguillier C, Schischmanoff O, Youlyouzmarmak I, Schlee M, Bornkamm GW, Raphael M, Feuillard J, Fagard R.

J Virol. 2005 Apr; 79(8): 4936-43.

Présentation de l'article

LMP1, est une protéine latente de la membrane plasmique. Elle possède un court domaine cytoplasmique N-terminal de 24 acides aminés, six domaines trans-membranaires et une longue queue cytoplasmique en position C-terminal de 200 acides aminés. Les domaines trans-membranaires peuvent s'oligomériser spontanément, mimant l'interaction récepteurs/ligand (ex : TNF-R/TNF-L) ce qui permet l'activation de LMP1 (Gires et al., 1997).

LMP1 détourne donc les molécules de signalisation TRAF/TRADD des TNF-R impliqués dans la signalisation des TNF-R (CD30, CD40 et CD95), ayant pour effet l'activation des voies de signalisations. NF- κ B, p38/MAPK et JNK1/AP1, et pour résultat de protéger en principe les cellules de l'apoptose et d'augmenter la prolifération cellulaire. Au niveau de la partie C-terminale cytoplasmique se trouvent 2 domaines, CTAR1 et CTAR2, sites d'interactions avec les molécules signal et d'activation des voies de signalisation (beaucoup de facteurs étant également des partenaires du complexe TNF-R). Ces 2 domaines participent à l'induction du facteur de transcription NF- κ B. Ainsi, Le domaine CTAR1 l'active faiblement (30% de l'activité de NF- κ B) en recrutant les molécules adaptatrices TRAF (TRAF1, TRAF2, TRAF3), tandis que le domaine CTAR2 l'active fortement (70%) en interagissant avec les molécules adaptatrices TRAF (TRAF2) par l'intermédiaire de TRADD ou de RIP (Izumi & Kief, 1997). CTAR2 active également la voie de signalisation JNK1/AP1 (Kieser et al., 1997). La voie p38/MAPK, médiateur de l'induction de cytokines par l'intermédiaire de kinases, est également induite par LMP1, par l'intermédiaire de TRAF6. Il a été observé une activation constitutive de STAT1 dans les tumeurs associées à

l'EBV telles que le carcinome du nasopharynx (Chen et al., 2001), le lymphome de Hodgkin (Garcia et al., 2003) et dans les LCL (Fagard et al., 2002, Weber-Nordt et al., 1996). STAT1 est un facteur de transcription activé en réponse aux interférons IFN et joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose. Dans le cas des LCL transformées par l'EBV, STAT1 est activé constitutivement par LMP1. Et d'après les travaux de Richardson et ses collaborateurs (Richardson et al., 2003), l'expression de LMP1 est suffisante pour engendrer de hauts niveaux d'activation de STAT1. Cependant le mécanisme par lequel la protéine virale LMP1 active STAT1 était un sujet de controverse. Une étude avait montré que JAK3 pourrait interagir avec un pseudo-domaine nommé CTAR3 (acide aminé de 275 et 330) localisé entre CTAR1 et CTAR2. Cette interaction permettrait la phosphorylation de STAT1 par JAK3 (Gires et al., 1999). Par la suite, il a été montré qu'il n'existe aucune interaction entre JAK3 et LMP1 aboutissant à l'activation de JAK3 (Higuchi et al., 2002). La transfection d'un variant LMP1 contenant trois mutations dans le CTAR1 et une mutation dans le CTAR2, dans une lignée de Burkitt inhibe l'augmentation de l'expression et l'activation de STAT1 par LMP1 (Brennan et al., 2001, Richardson et al., 2003). Ceci suggère l'implication de NF- κ B dans l'activation de STAT1 par LMP1. Le facteur de transcription NF- κ B est connu pour activer l'expression de nombreux gènes codants pour des cytokines ou des récepteurs de cytokines (Lu & Stark, 2004) tels que l'IFN γ (Sica et al., 1997) et son récepteur IFN γ R (Cahir-McFarland et al., 2004), les IFN α/β et leur récepteur IFN α/β R2. Les lymphocytes B immortalisés par l'EBV expriment les IFN α , β et γ ainsi que les gènes cibles de l'IFN γ (Baran-Marszak et al., 2002, Brewster et al., 1983, Cahir-McFarland et al., 2004, Carter et al., 2002, Peng et al., 1992).

Dans le but de comprendre le mécanisme exact d'activation de STAT1 par LMP1, et de déterminer si cette activation dépendrait de mécanismes indirects, Najjar et ses collaborateurs ont commencé par tester la capacité des surnageants de culture des cellules LCL, d'induire la phosphorylation de la tyrosine 701 de STAT1.

Pour ce faire, deux lignées cellulaires ont été utilisées, la lignée du lymphome de Burkitt EBV- (BL2) et la lignée lymphoblastoïde (LCL) EBV+ (PRI). Nous avons apporté le vecteur d'expression pRT1 où a été cloné l'ADNc codant pour I κ B α , l'inhibiteur de NF- κ B. Comme il a été mentionné précédemment, ce vecteur est caractérisé par la présence d'un promoteur bidirectionnel inductible par la Doxycycline, permettant l'expression du gène d'intérêt I κ B et le marqueur d'inductibilité : le récepteur tronqué NGFR.

La lignée LCL PRI a été ensuite transfectée par le vecteur pRT1-I κ B α dn puis sélectionnée à l'hygromycine afin de favoriser la prolifération des cellules ayant incorporé le vecteur. Nous avons induit les cellules à la Doxocycline (les cellules non induites sont le témoin) puis réalisé un tri cellulaire magnétique en utilisant un anticorps de souris anti-NGFR et des billes magnétiques. Différentes analyses en PCR quantitative ont été faites afin de déterminer l'implication de NF- κ B dans l'activation de STAT1. Les résultats obtenus dans l'EA 3406 ont montré que l'inhibition de NF- κ B par la surexpression de I κ B, inhibe la phosphorylation de STAT1. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur chimique de NF- κ B le BAY11. NF- κ B active STAT1 via les produits de ses gènes cibles IFN α , IFN β et IFN γ . En effet, nous avons montré par RCR quantitative que l'expression des ARNm des IFN est induite par NF- κ B (la surexpression de I κ B ou le traitement des cellules par le BAY11 réduit l'expression des IFN).

La contribution du laboratoire à ce travail a consisté à cloner l'ADNc I κ B dans le vecteur pRT, transfecter les cellules PRI par le vecteur puis les trier. Sur ces cellules induites ou non par la doxycycline, nous avons analysé l'état de phosphorylation de STAT1, le profil d'expression des interférons (IFN α et IFN γ) par PCR quantitative. Nous avons analysé par la suite l'expression des interférons par PCR quantitative après traitement des cellules par Bay11 dans l'EA3406.

Commentaires article 1

STAT1 est un facteur de transcription activé en réponse aux interférons. Sa surexpression ainsi que son activation ont été observées dans plusieurs cellules transformées par le virus d'Epstein Barr et dans certains tissus infectés par le virus (Fagard et al., 2002, Garcia et al., 2003, Weber-Nordt et al., 1996). La surexpression de STAT1 dans le contexte de l'EBV est hautement corrélée à l'expression de LMP1 et l'activation de NF- κ B (Gires et al., 1999, Richardson et al., 2003). Cependant, jusque là, aucune étude n'a pu montrer avec exactitude le mécanisme d'activation de STAT1 par LMP1 et le rôle que jouerait NF- κ B dans cette activation.

Cet article montre clairement que, dans les lymphocytes B immortalisés par l'EBV, STAT1 est activé constitutivement par les interférons dont l'expression est induite par NF- κ B. Ceci suggère que l'activation de NF- κ B par LMP1 est bien responsable de la production des IFN. Ainsi l'activation de NF- κ B par LMP1 stimule la sécrétion d'IFN γ et d'IFN α (Zhang & Papano, 2002). Nos résultats acquis de façon complémentaire et collaborative avec l'EA 3406, ont contribué à montrer que dans le contexte d'immortalisation des cellules par l'EBV, l'activation de STAT1 serait due à l'activation constitutive de NF- κ B, par LMP1. Ceci conduit, par une boucle autocrine de sécrétion, à activer le récepteur aux interférons, activant ainsi STAT1 secondairement. Le rôle des interférons dans ce processus a été prouvé par l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-interférons.

Article N°2

EBV latency III immortalization program sensitizes B-cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1 : role of NF- κ B, STAT1 and p53.

Le Clorennec C, youlyouz-Marfak I, Adriaenssens E, Coll J, Bornkamm GW, Feuillard J. *Blood*. 2006 Mar 1; 107(5): 2070-8.

Présentation de l'article

Au moins trois facteurs transcriptionnels sont activés par l'EBV, NF- κ B, STAT1 et p53. le premier étant anti-apoptotique et les deux autres pro-apoptotiques.

Dans cet article, nous avons étudié la régulation de l'expression du récepteur de mort Fas, induit par LMP1 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV, comme modèle pour comprendre la résultante de ces trois facteurs transcriptionnels dans le survie cellulaire.

D'après la littérature, l'expression de Fas est régulée par plusieurs agents cytotoxiques tels que le TNF- α , l'IFN γ ou la Daunorubicine, capables d'activer les facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et p53 respectivement. De plus, le promoteur du gène Fas est connu pour posséder des sites de fixation pour ces facteurs. Le virus d'Epstein Barr est connu pour moduler l'expression de Fas ainsi que l'activité des facteurs NF- κ B, STAT1 et p53.

Dans cette étude, nous avons utilisé les vecteurs d'expression inductibles épisomaux pRT1 où nous avons sous clonés les ADNc suivants : I- κ B α le dominant négatif de NF- κ B, l'isoforme active STAT1 α et son dominant négatif STAT1 β , p53 sauvage, LMP1 sauvage et un mutant dominant négatif de LMP1 : LMP1ct. Ces vecteurs ont été transfectés d'une manière stable dans une lignée lymphoblastoïde B LCL puis l'induction de l'expression de l'ADNc d'intérêt a été effectuée par traitement des cellules par la Doxycycline pendant 24h. Les cellules inductibles et exprimant ainsi le récepteur NGFR à leur surface, ont été purifiées en utilisant des billes magnétiques couplées avec l'anticorps anti-NGFR puis traitées par le TNF- α , IFN γ ou la Fludarabine* pendant 24h. Afin de mettre en évidence la régulation de Fas, nous avons utilisé plusieurs techniques telles que la PCR quantitative pour étudier la régulation des transcrits, le western blot et l'immunomarquage révélé par cytométrie en flux.

Dans le but de comprendre le rôle de la protéine virale LMP1 seule ou dans le contexte de latence virale III indépendamment de l'influence des autres protéines de l'EBV, nous avons utilisé la lignée cellulaire EREB-5 contenant le gène EBNA2 sous dépendance de l'œstrogène, transfectée ou non par les vecteurs pRT1.

La fonctionnalité de Fas a été étudiée en mesurant l'apoptose par des techniques de sous-pic G1 ainsi que des marquages en annexine V révélés par cytométrie en flux après le traitement des cellules par un agoniste de Fas capable de l'activer.

Nous avons montré que l'expression de Fas est régulée par STAT1, p53 et NF- κ B. De plus, l'inhibition de LMP1 diminue l'expression de Fas. Du point de vue physiologique, nous avons montré que l'induction de l'expression de Fas par LMP1 sensibilise les cellules B infectées par l'EBV à l'induction de l'apoptose médiée par le récepteur Fas. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence le rôle du programme de latence III dans la sensibilisation des lymphocytes B infectés par l'EBV à l'apoptose médiée par Fas. *In vivo*, ce processus permettrait l'élimination par le système immunitaire, des lymphocytes B infectés par l'EBV restés en latence III.

Commentaires article 2

Il a été précédemment montré une expression importante de Fas dans les lymphocytes B infectés par l'EBV (Falk et al., 1992). Des travaux ont même suggéré un rôle de LMP1 dans la régulation de l'expression de Fas (Henriquez et al., 1999). *In vivo*, une forte expression de Fas membranaire et soluble est observée chez des patients souffrant de mononucléose (Sato et al., 2000).

Dans cette étude nous montrons que LMP1 est responsable de l'induction de Fas par l'EBV ; et que les trois systèmes transcriptionnels NF- κ B, STAT et p53 contribuent à l'expression de ce gène. Nous montrons également que l'activation de STAT1 et de p53 sont secondaires à l'activation de NF- κ B. Enfin, nous montrons que l'induction de Fas par LMP1 sensibilise les cellules à l'induction de l'apoptose par les agonistes de Fas et par les lymphocytes T. Ces résultats soulignent pour la première fois le caractère ambivalent de l'oncogène viral LMP1, capable d'induire en même temps des signaux de survie et de mort.

Article N°3**Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents.**

Youlyouz-Marfak I, Gachard N, Le Clorennec C , Najjar I, Baran-Marszak F, Reminieras L, May E, Bornkamm GW, Fagard R, Feuillard J.

Cell Death and Diff. 2008 Feb; 15:376-385

Historique de l'étude

Au début de l'étude de la relation entre p53 et STAT1, nous avons utilisé principalement la lignée lymphoblastoïde PRI.

Nous avons transfecté les cellules par le vecteur inducible pRT1 exprimant la protéine p53 sauvage (wt) et muté (transcriptionnellement inactive) p53_{R248Q}.

STAT1 est constitutivement actif dans les LCL. Le traitement par la Fludarabine* active faiblement sa phosphorylation en tyrosine 701. L'induction de l'expression de p53 par la Doxycycline provoque la phosphorylation de STAT1. La Fludarabine* n'a pas d'effet sur cette phosphorylation probablement à cause d'un effet seuil. On observe la même chose lorsqu'on surexprime p53 muté. Nous remarquons que p53wt est phosphorylé en sérine 15 en absence de la Fludarabine ce qui suggère une auto-activation (Figure 53).

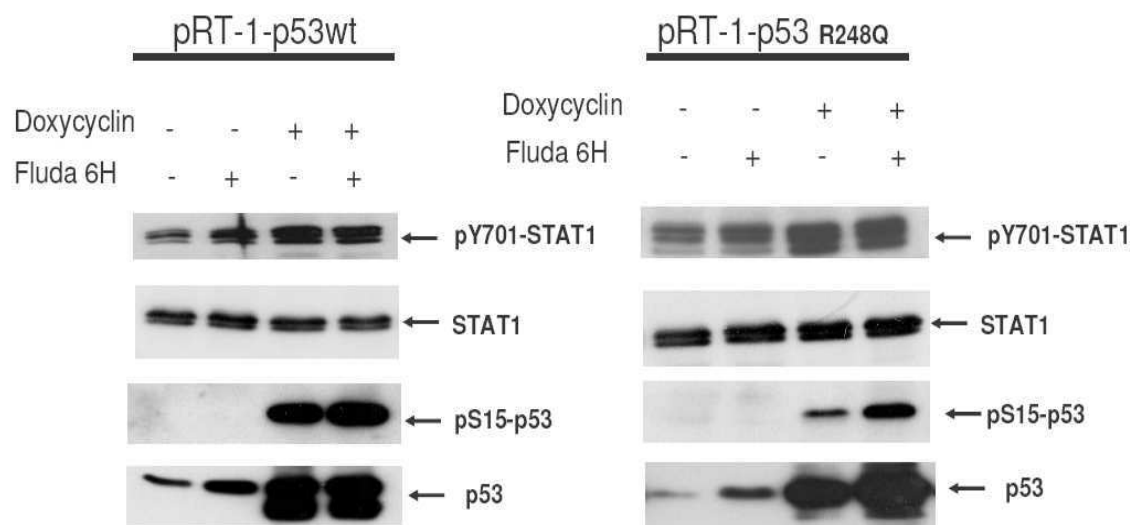


Figure 53 : L'induction de l'expression de p53 provoque l'activation de STAT1 dans les cellules LCL PRI : Les cellules transfectées par le vecteur inducible pRT1-p53wt et pRT1-p53R248Q sont induites à la Doxycycline durant 24H, triées puis traitées par la Fludarabine*. L'expression des protéines a été vérifiée par western blot.

Nous avons cloné accidentellement le gène MTBP qui code pour un activateur de MDM2 et donc favorise l'inhibition de p53 et sa dégradation. Son expression dans la lignée PRI réduit la phosphorylation de p53 par la Fludarabine*, induit la dégradation de p53 et reverse l'activation de STAT1 induite par la Fludarabine* (Figure 54). L'ensemble de ces résultats suggèrent que p53 serait impliqué dans l'activation de STAT1 par les agents génotoxiques.

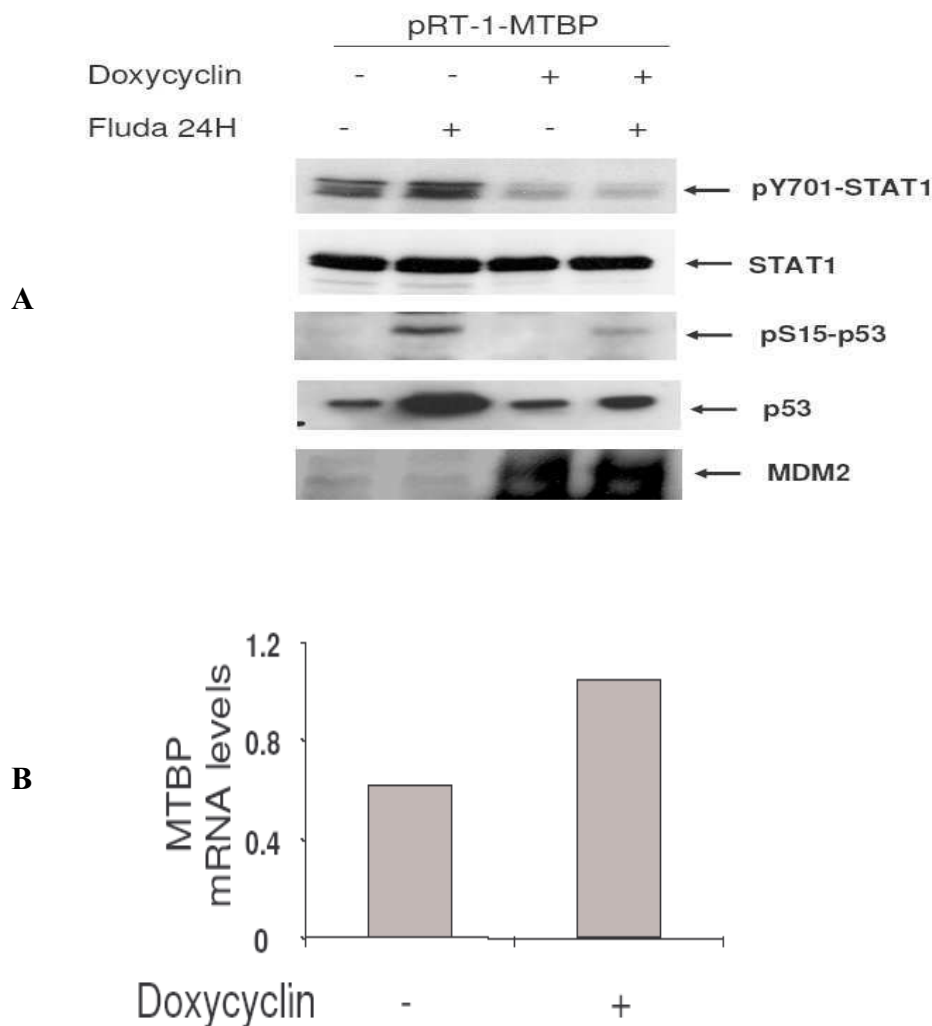


Figure 54 : L'induction de l'expression de MTBP reverse l'activation de STAT1 dans les cellules LCLs PRI : Les cellules transfectées par le vecteur inducible pRT1-MTBP sont induites à la Doxycycline durant 24H, triées puis traitées par la Fludarabine*. L'expression des protéines a été vérifiée par western blot (A). L'expression de MTBP a été quantifiée par PCR quantitative (B).

Ainsi, nos premiers résultats suggéreraient un rôle de p53 dans l'activation de STAT1. Mais ce modèle cellulaire EBV+ est assez compliqué à manipuler expérimentalement pour l'étude de l'interaction entre p53 et STAT1, du fait des interférences avec le virus. Pour cette raison, nous avons choisi de changer de modèles cellulaires et de travailler sur des lignées cellulaires EBV- (BL2, BL41, jurkat et HL60).

Présentation de l'article

p53 est un facteur de transcription multifonctionnel impliqué notamment dans la réponse cellulaire aux dommages d'ADN. Plusieurs études de littérature montrent une connexion entre les protéines étudiées STAT1 et p53 (Townsend et al., 2004, Baran-Marszak et al., 2004). L'étude de la relation existante entre ces deux facteurs transcriptionnels permettrait la compréhension des mécanismes fondamentaux du contrôle de la prolifération tumorale et la définition de nouvelles synergies thérapeutiques à visée anti-tumorale. Les deux facteurs de transcription p53 et STAT1 coopèrent dans l'induction de l'apoptose. De plus, STAT1 favorise l'activation de p53. Cependant, le rôle de p53 dans l'activation de STAT1 n'est pas bien établi. Le but de cet article est d'étudier le rôle de p53 dans l'activation de STAT1 au plan fonctionnel et structurel et de déterminer le mécanisme exact de la régulation de STAT1 par les agents chimiothérapeutiques tels que la Fludarabine *, la Doxorubicine et le Cisplatine.

Pour répondre à cette question nous avons utilisé les outils cellulaires et moléculaires suivants :

1) Les modèles cellulaires

Nous avons retenu plusieurs lignées cellulaires qui diffèrent par leur statut de la protéine p53 :

- Lignées p53 sauvage : la lignée lymphoblastoïde infectée par le virus d'Epstein barr en latence III (LCL) et la lignée de lymphome de Burkitt non infectée par le virus EBV (BL2)
- Lignée p53 muté : la lignée de lymphome de Burkitt non infectée par le virus EBV (BL41) dont la protéine p53 est mutée au niveau de son domaine de fixation à l'ADN. Le résidu arginyl en position 248 est remplacé par un résidu glutamyl ce qui modifie la structure tridimensionnelle de la protéine et réduit l'affinité de la protéine pour l'ADN. Cette protéine est transcriptionnellement inactive.
- Lignée p53 nulle : la lignée promyolytique HL60 et la lignée T Jurkat

Dans le cadre de ce mémoire, trois agents sont à l'étude :

La doxorubicine: C'est un agent intercalant appartenant à la famille des anthracyclines. Cette molécule possède une structure plane et est caractérisée par la présence de plusieurs noyaux

aromatiques qui lui permettent de s'intercaler entre deux brins. Son effet antiprolifératif est lié à plusieurs activités. D'une part, elle forme des liaisons avec l'ADN inhibant la synthèse de l'ADN et de l'ARN. D'une façon schématique, la Doxorubicine en s'intercalant dans l'ADN, stabilise le complexe topoisomérase II-ADN et produit des cassures de l'ADN et une défaillance de la réplication.

Le Cisplatine: (*cis* -diaminedichloroplatinum II) est un des médicaments les plus utilisés dans la lutte contre le cancer. Il est utilisé en clinique depuis 1978 pour traiter une variété de cancers dont celui des ovaires, des testicules et naso-pharyngés. C'est un agent alkylant qui dérive de la Platine qui pénètre dans la cellule par diffusion passive et par transport actif. Elle est caractérisée par la présence d'un groupe électrophile capable d'établir des liaisons covalentes avec l'ADN. Elle tue les cellules en causant des lésions dans l'ADN. Lorsqu'ils entrent dans la cellule, ses deux atomes de chlore subissent une attaque nucléophile et sont remplacés par des molécules d'eau. La molécule devient ainsi chargée positivement et réactive. Elle réagit avec l'ADN pour créer des liens intra brins et inter brins entre les résidus guanine adjacents .

La Fludarabine*: C'est un analogue anti-purines qui appartient à la classe des antimétabolites. Elle pénètre dans la cellule par voie passive, se métabolise en dérivés triphosphates puis s'incorpore dans l'ADN à la place des bases purines. Elle inhibe ainsi la réplication de l'ADN et la synthèse de *novo* des bases.

Contrairement à la Doxorubicine* et le Cisplatine qui agissent quelle que soit la phase du cycle cellulaire, la Fludarabine* agit spécifiquement pendant la phase S de réplication de l'ADN.

2) Les vecteurs d'expression

Les ADNc codant pour les protéines P53 sauvage p53wt et la protéine p53 mutée au niveau de l'arginine 248 (p53_{R248Q}) ont été clonés par PCR à partir des lignées cellulaires BL2 et BL41 respectivement, en utilisant les amorces suivantes : (p53-sens : 5'-GATTGGCCAGACTGCCTTC-3', p53-antisens :5'-CAAGGGTTCAAAGACCCAAA-3'). Après vérification de leurs séquences, ces 2 ADNc ont été clonés au niveau des sites HindIII-XbaI du vecteur pcDNA. Nous avons développé une collaboration avec le Pr. E. May, grâce à laquelle nous disposons de plusieurs variants structurels de p53 (Figure 55) (Munsch et al., 2000) clonés dans le vecteur d'expression pCMV : Il s'agit des mutants ponctuels p53_{R156P} et p53_{R273H} dont la mutation ponctuelle est localisée au niveau du domaine de fixation à l'ADN,

et des mutants déletés et/ou tronqués au niveau du domaine N-terminal et ou C-terminal de p53 $p53^{\text{del11-69}}$, $p53^{\text{trunc 355}}$, $p53^{\text{trunc 338}}$, $p53^{\text{del11-69 trunc 338}}$ and $p53^{\text{trunc 291}}$ (Yonish-Rouach et al., 1995, Munsch et al., 2000, Leblanc et al., 2002). Le vecteur codant pour le régulateur négatif de MDM2 est décrit dans l'article de Legube et col (Legube et al., 2002).

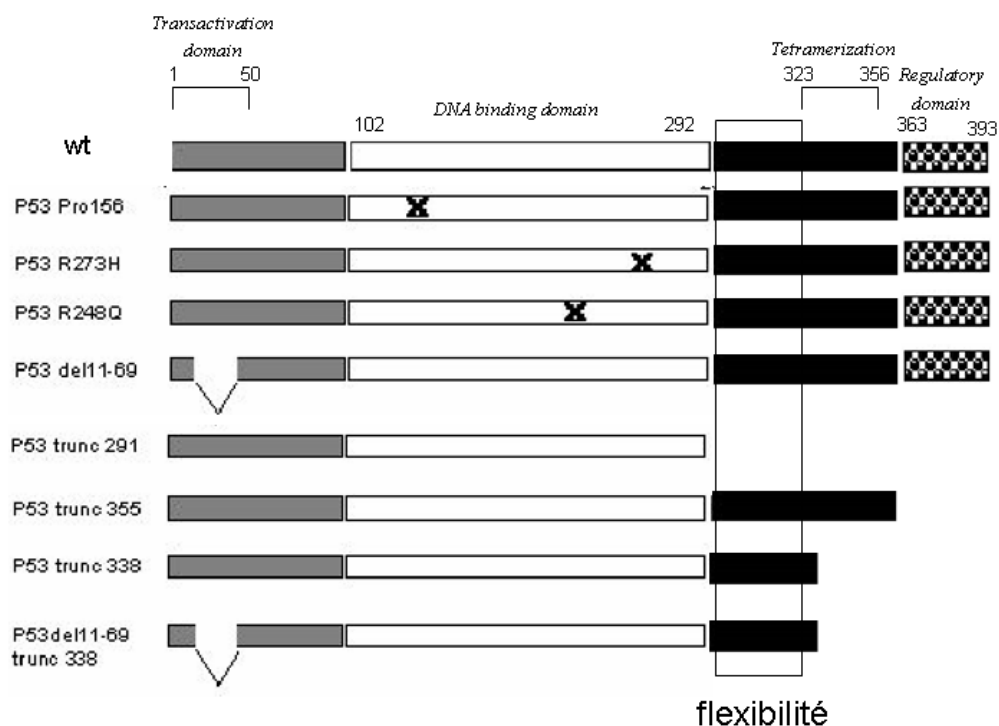


Figure 55 : Représentation schématique des différents variants de p53 (Conçue par E. May).

Nous avons tout d'abord traité les lignées cellulaires par trois agents anticancéreux de classes différentes : la Doxorubicine, Fludarabine* et le Cisplatine, et dont le mode d'action est également différent puis exploré l'état de phosphorylation et d'activation de STAT1. Nous avons ensuite utilisé divers variants structurels de la protéine p53 et étudié l'état d'activation de STAT1.

Commentaires article 3

Les expériences de traitement des cellules par les médicaments anticancéreux ont montré que le stress genotoxique induit l'activation de STAT1 indépendamment de l'activité transcriptionnelle de p53, et ceci dans les lignées BL2 et BL41 exprimant la protéine p53 mais pas dans les lignées p53 null HL60 et Jurkat. L'inhibition du trafic des vésicules par l'utilisation de la BrefeldinA ainsi que l'inhibition de la synthèse de l'ARNm par l'Actinomycine D n'ont pas d'effet sur la phosphorylation de STAT1 par la Doxorubicine.

Ces deux résultats montrent clairement que l'activation de STAT1 dans ce cas ne dépend pas de la néosynthèse d'un ARNm dont le produit pourrait activer STAT1 ou alors d'un effet autocrine résultant de l'excrétion de facteurs solubles.

La restauration de l'expression de p53 (sauvage ou muté) dans la lignée p53 null HL60 induit l'activation de STAT1. La surexpression de MDM2, l'inhibiteur naturel de p53, coexprimé avec p53 reverse la phosphorylation de STAT1. De même, l'utilisation de SiRNA p53 reverse la phosphorylation de STAT1 induite par la Doxorubicine. L'expression transitoire de divers variants structurels de p53 dans la lignée HL60 a montré que l'activation de STAT1 dépend de la présence de la protéine p53 et ne nécessite pas son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, ces expériences montrent également que le domaine central de fixation à l'ADN (DBD) jouerait un rôle important dans l'activation de STAT1. L'activation de STAT1 par les agents chimiothérapeutiques est reversée par le STI571 (glevec) l'inhibiteur de c-Abl. Les expériences d'immunoprécipitation suggèrent que les 3 protéines p53, STAT1 et c-Abl forment un complexe ternaire dont la proportion augmente après traitement. Les études fonctionnelles ont montré que la Doxorubicine sensibilise les cellules à l'apoptose à des doses limites d'IFN γ et d'IFN α .

Ces résultats montrent clairement le rôle que joue p53 dans l'activation de STAT1 lors d'un stress génotoxique. L'action de p53 est indépendante de son rôle de facteur de transcription mais fait intervenir des interactions protéine-protéine.

DISCUSSION

Afin de déterminer le rôle des cibles transcriptionnelles de l'EBV notamment NF- κ B, STAT1 et p53, et l'apoptose dans les lymphocytes B, nous avons tout d'abord contribué à l'étude des mécanismes d'activation constitutive de STAT1 par LMP1 en mettant la lumière sur le rôle de NF- κ B dans ce mécanisme. Ainsi, il a été montré qu'il existe une boucle autocrine d'activation des interférons par NF- κ B, qui conduit à l'activation de STAT1. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'implication des facteurs de transcriptions NF- κ B, STAT1 et p53 dans la régulation de Fas dans le contexte viral EBV. Nous avons pu montrer que, ces facteurs induits par LMP1, sont responsables de la régulation de l'expression de Fas notamment STAT1 et p53.

En parallèle, nous avons étudié la relation entre p53 et STAT1 lors de l'induction d'un stress cellulaire par des agents anticancéreux tels que la Doxorubicine, la Fludarabine* et le Cisplatine.

I. STAT1 dans le contexte viral EBV

La technique de cDNA array avait permis d'identifier les variations d'expression provoquée par l'expression des protéines de latence virale. Une étude réalisée sur des cellules du lymphome de Burkitt EBV+ a montré que la plupart des gènes surexprimés sont des cibles de LMP1 et dépendent des deux facteurs de transcription NF- κ B et STAT1 (Baran-Marszak, et al, 2004).

Les STAT sont des facteurs de transcription activés en réponse à des facteurs de croissance, de cytokines. Ils jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose et la prolifération cellulaire ainsi que l'expression de certains marqueurs de surface. Il a été observé que STAT1 est constitutivement actif dans les lignées lymphoblastoïdes (LCL) et dans les lignées de Burkitt (BL) EBV+ (Weber-Nordt 1996, Fagard et al., 2002). L'activation de STAT1 est retrouvée dans plusieurs pathologies associées à l'EBV. STAT1 est activé dans les cellules de Reed-Stenberg (Garcia et al., 2003) et dans les lymphomes B à grande cellules (Savage et al., 2003). L'activation de STAT1 par l'EBV implique la protéine virale LMP1 (Gires et al., 1999, Richardson et al., 2003) capable d'activer plusieurs voies de transduction du signal, notamment la voie NF- κ B.

Deux questions se posaient donc à la fin des années 90, celle du mécanisme d'activation de STAT1 et de son rôle dans les cellules EBV+. En effet, comme dit dans l'introduction, l'activation de STAT1 implique la phosphorylation des protéines kinases JAK, non connues à l'époque pour se fixer sur LMP1. De plus, STAT1 est en principe impliqué dans la régulation de l'apoptose indépendante via IRF1.

La surexpression de LMP1 induit une augmentation de la fixation de STAT1 sur ses séquences d'ADN cibles (Gires et al., 1999). D'après certains travaux, LMP1 pourrait fixer JAK3 via son domaine CTAR3 mais de façon dépendante de CTAR1 et CTAR2. Cette interaction permettrait l'activation de STAT3, STAT1 et probablement STAT5 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV (Gires et al., 1999, Chen et al., 2001, Chen et al., 2003). Mais cela demeure controversé. Ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres équipes (Higuchi et al., 2002). Le groupe de Rowe avait montré que les cellules B transfectées par LMP1 induisent l'activation de STAT1 dans les cellules B LMP1 négatives (McLaren et al., 2007).

Les travaux présentés dans l'article 1 montrent clairement que l'activation constitutive de NF- κ B par LMP1 induit l'expression des interférons α et γ . Ces facteurs, une fois sécrétés, vont se fixer à leurs récepteurs et activer la voie JAK/STAT1 par un effet autocrine. L'interprétation de ces données ne requiert aucunement que le domaine CTAR3 soit impliqué dans l'activation de STAT1.

Le mécanisme proposé est le suivant : En aval de LMP1, NF- κ B induit l'expression de l'IFN γ . Une fois sécrété, l'IFN γ se fixe à son récepteur membranaire et induit la phosphorylation de la tyrosine 701 de STAT1. De plus, il a été montré une activation constitutive de STAT2 (résultats non montrés), cohérente avec l'expression et la sécrétion de l'IFN α . Ceci peut correspondre soit à l'activation de NF- κ B par LMP1 qui stimule la sécrétion de l'IFN γ et l'IFN α , soit à l'induction secondaire de l'IFN α par l'IFN γ .

Cependant, ce modèle n'explique pas la phosphorylation résiduelle de STAT1 observée dans les LCL. En effet, le traitement des cellules par la Brefeldin A réduit la phosphorylation de STAT1 sans l'abolir complètement (figure 2B articles 1, Figure 2C article 3). L'agent pharmacologique utilisé pourrait ne pas être complètement efficace. Également, ceci pourrait être dû à un mécanisme d'activation intracellulaire dépendant de LMP1 (Gires et al., 1997) faisant intervenir des récepteurs des IFN intracellulaires ou une autre kinase.

Le facteur de transcription NF- κ B est supposé participer à la cancérogenèse associée à l'EBV parce que régulant la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose. L'induction de la sécrétion des IFN et l'activation de STAT1 par LMP1 est la première donnée nous ayant conduit à proposer le caractère « ambivalent » de l'activation de NF- κ B par l'EBV.

En effet, le travail de Fanny Baran-Marszak, réalisé en collaboration avec notre laboratoire, montre que STAT1 sensibilise la cellule à l'apoptose induite par l'agent anticancéreux Fludarabine* et régule également l'activation de p53. La surexpression de l'isoforme actif STAT1 α active STAT1 et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par la Fludarabine*. La surexpression de l'isoforme STAT1 β inhibe l'activation de STAT1 et favorise la prolifération des cellules. Ainsi STAT1 β peut interférer avec l'activation de STAT1 en (i) saturant les sites de fixation de STAT1 α au niveau du récepteur ce qui explique l'activation constitutive de STAT1 dans les LCL (ii) occupant les sites de fixation de STAT1 au niveau de l'ADN ce qui conduit à l'inhibition de l'expression de ses gènes cibles. Ceci suggère l'existence d'une balance STAT1 α /STAT1 β qui régule la prolifération cellulaire et l'apoptose. Lorsque l'isoforme STAT1 α est majoritaire la cellule meurt par apoptose. A l'opposé quand STAT1 β est supérieur à STAT1 α l'apoptose est inhibée et la cellule tend à proliférer (Baran-Marszak et al., 2004).

II. Rôles de STAT1, p53 et NF- κ B dans l'expression de Fas dans le contexte EBV

Comme c'est le cas pour d'autres virus immortalisant comme HTLV1, l'inhibition du processus d'apoptose cellulaire par l'EBV permet leur réplication, leur multiplication et leur persistance dans l'organisme (infections chroniques). A l'inverse, l'apoptose peut être un moyen de dissémination comme pour les adénovirus (par phagocytose des corps apoptotiques) (Mi et al., 2001).

LMP1 peut induire des gènes codant pour des molécules pro et anti-apoptotiques, contrôlant ainsi le processus d'apoptose (Dirmeier et al., 2005). Dans les lymphocytes B, l'apoptose est inhibée par LMP1 via la voie NF- κ B et ses gènes cibles anti-apoptotiques (BCL2, MCL-1 ou A20) (Young et al., 1999), des oncoprotéines pro-apoptotiques comme BAX (Grimm et al., 2005) ou alors en inactivant le p53 (Shao et al., 2004). Cependant, certains travaux ont montré que l'EBV peut conduire à l'induction de l'apoptose, notamment par l'intermédiaire de LMP1. Un niveau d'expression élevé de LMP1 provoque l'apoptose des cellules épithéliales et des neutrophiles (Larochelle et al., 1998).

Un fait connu mais non expliqué au plan fonctionnel était l'induction de Fas par l'EBV. Il a été rapporté une forte expression de Fas dans les lymphocytes B immortalisés par l'EBV. Cette forte expression pourrait être due à la forte densité du récepteur CD40 et son activation par son ligand (De Paoli et al., 1997).

Du point de vue fonctionnel, il a été montré à la fois *in vivo* et *in vitro*, que la forte expression de Fas est associée à l'induction de l'apoptose par un anticorps monoclonal spécifique anti-Apo1 dans les LCL (Durandy et al., 1997). D'après cette étude, les lymphocytes B immortalisés par l'EBV sont sensibles à l'apoptose induite par Fas ce qui les sensibilisent à la destruction par les cellules T.

Nos résultats (article 2) montrent que LMP1 est responsable de l'augmentation de l'expression de Fas via l'activation de NF- κ B.

Le promoteur du gène Fas comporte des sites de fixation pour les facteurs transcriptionnels NF- κ B, STAT1 et p53 (Leithauser et al., 1993, Behrmann et al., 1994, Muller et al., 1998). De plus, des agents connus pour activer ces trois systèmes transcriptionnels tels que le TNF α , IFN γ ou des agents anticancéreux comme la Fludarabine* (Krammer et al., 2000). Les résultats obtenus dans la lignée EREB2-5 montrent que le rétablissement du programme de latence III de l'EBV par l'induction de l'expression d'EBNA2 et donc de LMP1 induit l'expression de Fas. Egalement, nous montrons que l'induction de la latence III est associée à l'activation de NF- κ B et STAT1, ce qui était attendu mais aussi de p53.

L'utilisation d'un système inductible de LMP1 dans des cellules HeLa montre que LMP1 potentialise l'apoptose induite par le récepteur Fas ou l'Etoposide (condensation de la chromatine, activation de la caspase 3 exécutive, clivage de la PARP, diminution de l'expression de BCL2), avec inhibition de la voie des TNFR (Zhang et al., 2002). LMP1 potentialise également le processus induit par l'Etoposide par activation de la caspase 2 initiatrice et de la caspase 3, dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial, relargage de cytochrome C et condensation de la chromatine (Zhang et al., 2005). La potentialisation par LMP1 de l'apoptose induite intervient précocement dans la réponse apoptotique (en amont de la caspase 2) et implique le domaine C-terminal de LMP1, ce qui, d'après les auteurs, laisse envisager des applications dans le traitement des tumeurs d'origine épithéliales associées à l'EBV. Ces résultats, avec les nôtres, montrent que LMP1 est ambivalent car capable d'activer d'une part la voie anti-apoptotique NF- κ B et de protéger

ainsi les cellules de l'apoptose, et d'autre part il les sensibilise à l'apoptose en induisant des facteurs pro-apoptotiques comme STAT1, p53 et Fas (Figure 56).

La surexpression de LMP1 sauvage (LMP1wt) et de son variant négatif LMP1ct a montré clairement que la contribution de LMP1 dans la régulation de Fas est plus importante que chacun des trois facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et p53 pris individuellement. Cela suggère l'existence d'un effet synergique et combinatoire entre tous ces facteurs qui aboutit à la régulation du promoteur du gène Fas. La surexpression de LMP1, pourtant réputée transformante (Mosialos et al., 2001), est donc toxique pour la cellule. Certains de nos résultats actuels suggèrent que cette surexpression de LMP1, dans un modèle de LCL immortalisé par l'EBV sous le contrôle de latence III, induit une apoptose massive des cellules via l'auto-agrégation de Fas indépendante du ligand.

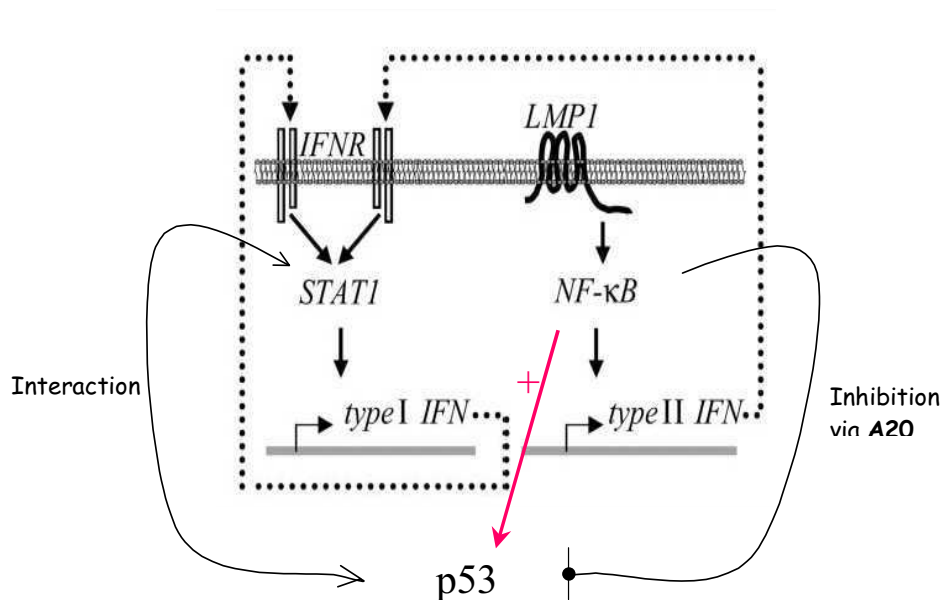


Figure 56 : Schéma récapitulatif des interactions entre NF- κ B, STAT et p53 dans les LCL (D'après (Najjar et al, 2005)).

Plusieurs études ont montré clairement le rôle de NF- κ B dans la protection des cellules contre l'apoptose. Le fait que LMP1, inducteur de NF- κ B, puisse induire l'arrêt de la prolifération cellulaire (Floettman et al., 1997) et/ou l'apoptose est réminiscent de l'action de certains oncogènes cellulaires tels que c-myc. C-myc régule également p53 et peut induire l'apoptose. Le potentiel proliférant de c-myc s'exprime dans les cellules tumorales uniquement en présence d'un autre événement oncogénique tel que l'inactivation de p19/ARF. Ceci est

interprété comme un mécanisme cellulaire de « sécurité » permettant de prévenir une prolifération inappropriée des cellules normales. Ainsi, LMP1 se comporte comme un oncogène ambivalent, fonctionnellement plus proche des oncogènes cellulaires que des oncogènes viraux (v-Src, vRel) ou chimériques comme le BCR-Abl, sélectionnés pour favoriser la prolifération cellulaire. La sensibilisation des cellules à l'apoptose par les cellules du système immunitaire à des taux normaux de LMP1 ou l'induction de l'apoptose à des taux très élevés de LMP1 est sans doute en rapport direct avec les boucles de régulation négative mise en jeu par l'activation par NF- κ B.

LMP1 agit comme un récepteur actif régulant les facteurs de transcription cellulaires et comportant sa propre boucle de rétrocontrôle. En effet, le promoteur de LMP1 peut être activé par JNK et inhibé par NF- κ B (Goormachtigh et al., 2006). Eliopoulos et al. ont montré que A20, comme pour le CD40 et d'autres TNFR, peut inhiber les voies de signalisation NF- κ B et JNK induites par LMP1 par l'intermédiaire de CTAR1 ou de CTAR2 (Eliopoulos et al., 1999). Cette inhibition se fait, au moins en partie par une interaction directe de A20 avec LMP1, entraînant une déstabilisation de l'interaction de TRAF1, au niveau de CTAR1, et de TRADD, au niveau de CTAR2 (Fries et al., 1999). L'implication directe des activités déubiquitineuse et ubiquitine ligase de A20 dans l'inhibition de la signalisation de LMP1 n'a pas été vraiment démontrée. Cependant, on peut supposer, d'après les obtenus pour les TNFR, que A20 peut agir de façon directe pour inhiber la signalisation induite par LMP1. Ainsi, d'un point de vue « finaliste », il apparaît que le niveau d'expression de LMP1 est régulé de façon suffisante et fine pour protéger les cellules contre l'apoptose mais pas trop haut afin d'éviter une auto-activation de Fas (article en révision).

III. Relation entre STAT1 et p53

Position du problème

Avec d'autres et en collaboration directe avec l'EA 3406, nous avons montré que STAT1 et p53 interagissent physiquement dans les cellules infectées par l'EBV. Récemment, l'équipe de McDermott a montré que l'apoptose dépendante de CD95 induite par les agents génotoxiques active p53 d'une façon dépendante de STAT1 (McDermott et al., 2000). Townsend et collaborateurs ont montré que la phosphorylation de STAT1 en sérine 727 diminue le niveau d'expression de MDM2 et induit l'activation de p53 et sensibilise ainsi la

cellule à l'apoptose (Townsend et al., 2004). Une étude récente a montré que l'activation de STAT1 augmente l'effet cytotoxique de la Doxorubicine. Ainsi l'activation de STAT1 peut être considérée comme un événement pro-apoptotique (Thomas et al., 2004). A la lumière de toutes ces données, il apparaît que p53 et STAT1 coopèrent dans l'induction de l'apoptose et que STAT1 favorise l'activation de p53. Cependant, le rôle de p53 dans l'activation de STAT1 n'est pas bien établi.

Un résultat que nous avons obtenu dans le modèle EBV est que la surexpression de p53 induit l'activation de STAT1. Ce résultat posait la question du mécanisme d'activation de STAT1 par p53. Le modèle des lignées cellulaires lymphoblastoïdes infectées par l'EBV est compliqué à analyser pour l'étude des interactions entre p53 et STAT1 d'un point de vue strictement mécanistique. En effet, comme il a été mentionné antérieurement, l'EBV est responsable d'une activation constitutive de NF- κ B, STAT1 et de p53 impliquant la voie TRAF/TRADD et associant des phénomènes autocrines. Trop de paramètres devaient être contrôlés en même temps dans ce modèle cellulaire, pour qu'un plan expérimental réaliste puisse être imaginé.

Nous avons choisi d'utiliser plusieurs lignées cellulaires EBV- dont le statut p53 est différent et de les traiter avec trois médicaments anticancéreux Doxorubicine, Cisplatine et la Fludarabine* connus pour activer p53. Nos résultats (article 3) montrent que les agents génotoxiques induisent la phosphorylation de STAT1 en Tyrosine 701 ainsi que son activation dans les lignées exprimant p53 sauvage, BL2, et p53 muté, BL41, mais pas dans les lignées déficientes en p53. Cette phosphorylation de STAT1 n'implique ni activité transcriptionnelle, ni néosynthèse d'un facteur protéique ou excrétion d'un facteur soluble. Des expériences de restauration de l'expression de p53 sauvage ou de trois mutants transcriptionnellement inactifs (Arg 248, pro 156, Arg 273) dans la lignée HL60, suggèrent que l'activation de STAT1 par des activateurs de p53 dépend de la présence de la protéine p53 indépendamment de son activité transcriptionnelle.

Le partenariat p53, STAT1, p53 et ATM

1. Les données expérimentales

L'utilisation de plusieurs variants de p53 a permis de mieux comprendre la relation entre STAT1 et p53. Il est apparu que le domaine de fixation à l'ADN est impliqué dans l'activation de STAT1, cela indépendamment de la phosphorylation de la sérine 15 de p53 et

de son activité transcriptionnelle. Outre p53, ATM peut phosphoryler la tyrosine kinase c-Abl (Baskaran et al., 1997). C-Abl est un partenaire connu de p53 et est impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de p53 par stabilisation de son tétramère (Wei et al., 2005). Ainsi, cette kinase était une candidate possible quand à l'activation de STAT1 suite à un stress génotoxique. Nous montrons que ATM et STAT1 font partie du même complexe protéique et nous confirmons que les trois protéines p53, STAT1 et c-Abl interagissent physiquement au minimum deux par deux. L'utilisation du STI571 (Glevec*) inhibiteur de l'activité kinase de c-Abl a montré que c-Abl est sans doute la tyrosine kinase impliquée dans la phosphorylation de STAT1 en présence de p53. L'exploration de la compartimentalisation des facteurs protéiques impliqués dans cette étude a montré que p53, STAT1, c-Abl ainsi qu'ATM coexistent dans le noyau en absence de stress et cette coexistence est renforcée suite à un traitement par la Doxorubicine.

2. Les conditions théoriques d'existence d'un complexe protéique sont-elles applicables à STAT1, p53, ATM et c-Abl ?

Différentes études ont montré que les protéines impliquées dans un complexe protéique présentaient des propriétés communes. Notamment, il a été suggéré que les protéines d'un même complexe :

- *Sont codées par des gènes dont les profils d'expression sont similaires (Jansen et al., 2002, Simonis et al., 2004) :*

Or l'expression de STAT1 est induite par les interférons mais pas celle de p53. Réciproquement, l'expression de p53 est augmentée par les inducteurs du stress cellulaire mais aucune donnée n'a été retrouvée à ce sujet pour STAT1. Cependant, d'autres exemples de complexes comme p65/p50, montrent que deux partenaires d'un même complexe peuvent avoir des profils d'expression différents.

- *Ont tendance à évoluer de manière coordonnée sur le plan phylogénétique (Fraser et al., 2002, Goh et al., 2002) :*

On dit que deux gènes ont co-évolué lorsqu'ils sont tous les deux soit présents soit absents dans tous les génomes considérés. D'après les données obtenus sur le site STRING de l'EMBL dédié à la prédiction *in silico* des interactions

entre les protéines (Figure 57), nous constatons que les 4 protéines d'intérêt évoluent de la même manière et sont conservées au cours de l'évolution.



Figure 57 : Occurrence Phylogénétique des gènes p53, STAT1, c-Abl et ATM (D'après le site <http://string.embl>).

- *Participent aux mêmes processus cellulaires et sont présentes dans les mêmes compartiments subcellulaires (Von mering et al., 2002, Sprinzak et al., 2003, Schwikowski et al., 2000) :*

En rapport avec la fonction, ATM, STAT1, p53 et c-Abl sont des facteurs impliqués dans la régulation de la mort cellulaire et sont activés en réponse aux stress cellulaire.

En rapport avec la localisation, p53 est en perpétuel transit entre le cytoplasme et le noyau (May et al., 1999, Stommel et al., 1999). Dans les cellules normales, l'expression de p53 est maintenue à un faible taux par l'interaction avec son régulateur, MDM2. Le gène MDM2 est induit par p53 et la protéine MDM2 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 en diminuant sa stabilité et en favorisant sa dégradation. MDM2 favorise la relocalisation de p53 du noyau vers le cytoplasme (Alarcon-Vargas & Ronai, 2002). La localisation de p53 peut être régulée également par : des modifications post-traductionnelles qui vont favoriser ou pas l'accumulation de p53 dans le noyau, et par oligomérisation (Liang et al., 1998, Liang et al., 1999).

STAT1 est également en perpétuel mouvement entre le noyau et le cytoplasme (Lillemeier et al., 2001). En absence de stimuli, STAT1 est sous forme latente monomérique dans le cytoplasme. Cependant, la présence de STAT1 non phosphorylée a été mise en évidence dans le noyau (Marg et al., 2004, Chatterjee-Kishore 2000).

La tyrosine kinase c-Abl transite également entre le cytoplasme et le noyau. Mais elle est majoritairement nucléaire (Taagepera et al., 1998). Elle peut ainsi assurer la transduction du signal du noyau vers le cytoplasme et inversement. La localisation nucléaire de c-Abl est primordiale pour son activité pro-apoptotique (Kharbanda et al., 1995, Liu et al., 1996).

L'étude réalisée sur le site <http://string.embl> représentée dans la figure 58, fait le bilan de toutes les données bibliographiques et expérimentales recensées sur p53, STAT1, c-Abl et ATM.

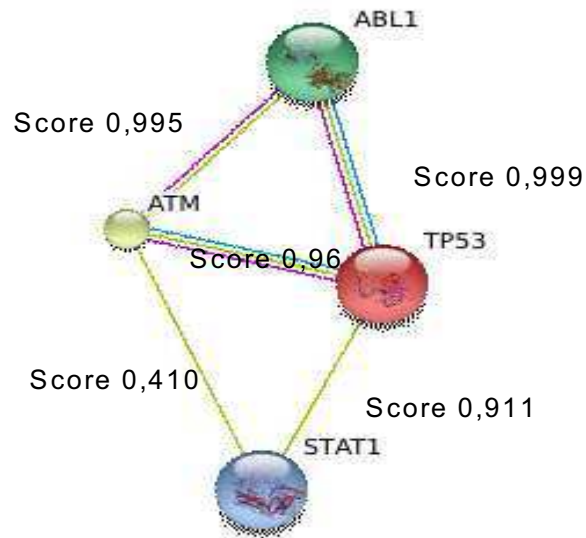


Figure 58 : Représentation prédictive de la voie d'interaction entre p53, STAT1, c-Abl et ATM avec les scores d'association (D'après (<http://string.embl>)).

D'après toutes ces données, la présence de p53, STAT1, c-Abl et ATM au sein du même complexe est une possibilité théorique et spéculative. On peut noter que ce site n'est pas complètement mis à jour puisque les données expérimentales établissent l'interaction p53-STAT1 ne sont prises en compte.

3. La relation structure-fonction entre p53 et STAT1 : *Le modèle proposé*

Les points essentiels des expériences de transfection des mutants de délétion de p53 sont les suivants :

- Les variants Arg 248, Arg 273 et Arg156 ont une très faible activité transcriptionnelle p53 et sont capables d'activer STAT1. Les mutants délétés en N-terminal (del11-69 et del 11-69 trunc 338) n'ont pas d'activité transcriptionnelle et activent STAT1.
- Le mutant trunc 291 dépourvu de la partie C-terminale induit une forte activation de STAT1. Ceci suggère que l'activation de STAT1 ne nécessite pas la formation de tétramère p53.

- Le mutant trunc 355 n'a pas d'effet sur l'activation de STAT1. Ceci pourrait s'expliquer par sa capacité à tétramériser et l'absence du domaine régulateur C-terminal qui aurait comme conséquence une stabilité accrue du tétramère.

Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent :

1. l'absence de corrélation entre la phosphorylation de la sérine 15 de p53 et l'activation de STAT1,
2. que le domaine central de fixation à l'ADN est impliqué dans l'activation de STAT1. L'engagement constitutif du domaine d'oligomérisation dans le tétramère masquerait le DBD affectant l'activation de STAT1 (effet de p53 trunc 355 et de p53 trunc 291). l'activation de STAT1 impliquerait la tyrosine kinase c-Abl,
3. que STAT1, p53 et c-Abl interagissent physiquement au moins 2 à 2 et interagissent avec ATM, conduisant à l'hypothèse d'un complexe ATM/p53/c-Abl/STAT1,
4. que ce complexe serait plutôt nucléaire.

A la lumière de nos résultats expérimentaux et des données bibliographiques, nous proposons que STAT1, p53 et c-Abl interagissent physiquement pour former un complexe protéique avec ATM. Dans notre modèle, ATM servirait de plateforme permettant l'activation coordonnée de STAT1, p53 et c-Abl. Le complexe ainsi formé serait transitoire et les différentes protéines vont se dissocier pour effectuer leurs fonctions respectives (Figure 59).

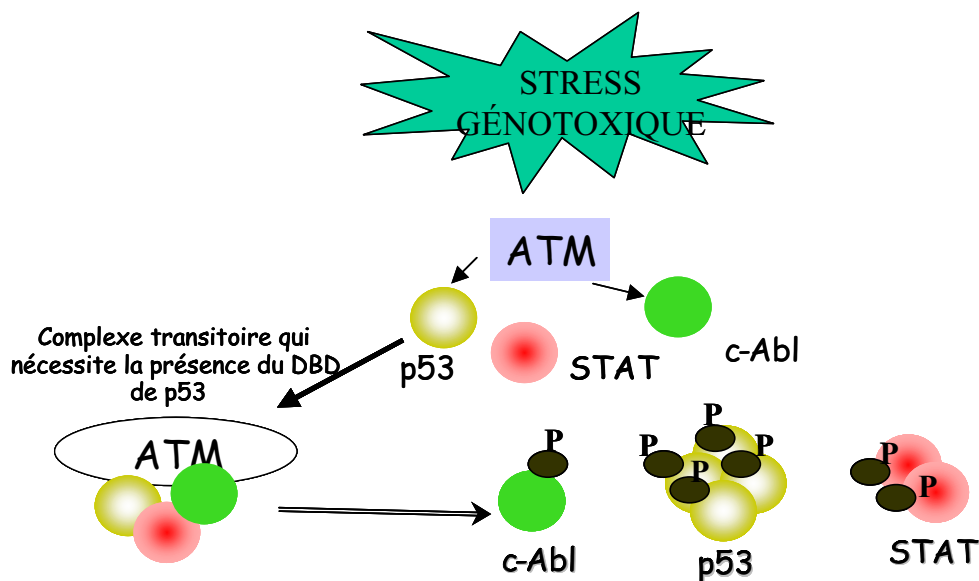


Figure 59 : Modèle hypothétique d'activation de STAT1 par c-Abl en présence de p53.

Dans ce modèle d'activation de STAT1 par c-Abl en présence de p53, l'augmentation du niveau protéique de p53 causé par le stress génotoxique ou par la transfection des cellules p53 null par des vecteurs exprimant p53 serait suffisante pour déclencher le mécanisme d'activation de STAT1.

4. La discussion du modèle hypothétique d'activation de STAT1

Notre modèle rend compte de nos résultats expérimentaux mais présente certaines limites :

Le rôle d'ATM

L'expérience d'immunoprécipitation d'ATM a montré que les protéines STAT1 et ATM font partie d'un même complexe protéique. Cependant, nous ne disposons d'aucune preuve supplémentaire qui montre qu'en absence d'ATM, STAT1 ne serait pas activé.

Le rôle du DBD de p53

Pour mieux comprendre le rôle du domaine central de p53 ainsi que l'incompatibilité de l'oligomérisation de p53 avec l'activation de STAT1, nous allons réaliser une série d'expériences. Tout d'abord, nous allons faire des expériences d'immunoprécipitation sur des extraits cytosoliques et nucléaires des cellules HL60 transfectées par le variant p53trunc 291 et p53wt (témoin), puis révéler les protéines p53, STAT1 et c-Abl. Puis, nous allons construire une protéine p53 dépourvue du domaine central que nous allons ensuite transfecter dans la lignée HL60 et explorer l'activation de STAT1.

Les deux domaines DBD et C-terminal de p53 sont fortement régulés. Le domaine DBD peut être régulé positivement ou négativement par des interactions avec d'autres protéines comme ASPP1 et MDM2. Le domaine C-terminal, par ses modifications post-traductionnelles et des interactions avec des facteurs protéiques, est impliqué dans la régulation positive et négative de l'activité transcriptionnelle de p53 (Vogelstein et al., 2000). Il a été montré qu'il existe un site de fixation à l'ADN contenu dans le C-terminal capable de se fixer aux CDS et CSB (Lee et al., 1995, Bakalkin et al., 1995). Par conséquent le domaine C-terminal de p53 pourrait entrer en compétition avec le DBD pour se fixer à l'ADN (Bayle et al., 1995, Anderson et al., 1997, Ayed et al., 2001) ou constituer un autre site d'accrochage à l'ADN permettant la stabilisation du complexe p53/ADN (Cain et al., 2000, McKinney et al., 2002, McKinney et al., 2004). L'oligomérisation de p53 peut masquer les motifs NLS et NES ce qui permet « le

switch » entre la forme monomérique et oligomérique. L'expression ectopique du domaine d'oligomérisation favorise la rétention nucléaire de p53 ce qui suggère que l'oligomérisation inhibe l'export de p53 en masquant probablement le motif NES. Or, p53 muté au niveau du domaine d'oligomérisation, peut être importé dans le noyau aussi bien sous forme oligomérique que monomérique (Liang et al., 1999).

Pour répondre à la question de la relation entre la formation du tétramère p53 et « l'indisponibilité » du DBD par tetramérisation de p53, il serait très intéressant de faire des expériences de mutagenèse dirigée afin de produire des mutants ponctuels du domaine d'oligomérisation ayant perdu de ce fait, la capacité de former des tétramères.

L'interaction p53 /c-Abl

Nie et ses collaborateurs ont montré que l'interaction entre c-Abl et p53 nécessite la présence du domaine d'oligomérisation (323-356) et le domaine C-terminal de régulation négative (363-393) (Nie et al., 2000, Wei et al., 2005). Ils ont utilisé des variants de p53 (p53 del(1-92), p53 trunc 292, p53 del (316-322), p53 del (325-356) et p53 trunc 363), et ont trouvé que seuls les variants p53 del(1-92) et p53 del(316-322) peuvent se fixer à c-Abl. Ainsi nos variants p53 tronqués en C-terminal ne pouvant se lier à c-Abl, ils ne devraient pas activer STAT1. Or, ces variants favorisent l'activation de STAT1.

D'après notre modèle, la phosphorylation de STAT1 se ferait dans le noyau et la formation du complexe protéique permettrait le rapprochement de c-Abl de son substrat STAT1. En effet, l'étude menée par Marg et ses collaborateurs ont montré que STAT1 peut transiter vers le noyau sous forme monomérique non phosphorylée (Marg et al., 2004). Ainsi, on peut supposer que p53 interagit avec STAT1 et l'expose à c-Abl pour qu'il le phosphoryle. Ceci pourrait se faire avec ou sans interaction directe entre p53 et c-Abl. Ainsi, dans le cas d'une cellule p53 positive (sauvage ou mutant ponctuel), le traitement par la Doxorubicine active ATM qui va activer c-Abl et p53. Ce dernier interagissant avec STAT1 et le rend accessible à c-Abl avec qui il interagit également. On retrouve la même chose dans la lignée HL60 transfectée.

L'utilisation de variants fonctionnels de c-Abl tronqués en C-terminal (Site de fixation à p53) et donc ne pouvant fixer p53 mais ayant gardé leur activité kinase, serait très utile pour trancher quant à l'interaction directe entre c-Abl et p53 et la phosphorylation de STAT1.

La localisation du complexe protéique

Le variant p53 trunc 291 est dépourvu du motif NLS est théoriquement cytosolique et p53del 11-69 trunc 338 n'a pas de NES et donc est nucléaire. Ces deux mutants sont capables d'activer STAT1.

Dans le cas où p53 est séquestré dans le cytoplasme à cause de l'absence de NLS (trunc 291), trois hypothèses peuvent expliquer l'activation de STAT1 p53: (i) p53 interagit avec STAT1 dans le cytoplasme et le complexe p53/STAT1 pourrait être importé vers le noyau en utilisant le motif NLS de STAT1 ou, (ii) p53 et STAT1 interagissent dans le cytoplasme et c-Abl est exporté du noyau vers le cytoplasme (Figure 5 article 3) où il va phosphoryler STAT1. Cette hypothèse est peu plausible car elle est en contradiction avec l'observation de l'interaction entre ATM et STAT1. De plus, elle ne rend pas compte de l'activation coordonnée de p53 et STAT1 (iii) p53 trunc291 diffuse passivement à travers les pores nucléaires. Ce mécanisme ne nécessite pas d'interaction entre la séquence NLS de p53 et l'importine. En effet, il existe un certain degré de diffusion passive permettant le passage de particules de faibles poids moléculaires et de petit diamètre (Görllich & Kutay, 1999, Wang et al., 2007).

Pour répondre à ces questions, nous avons tenté de faire des études d'immunofluorescence et de microscopie confocale.

Les premiers résultats obtenus par simple marquage p53, STAT1 ou c-Abl1 dans la lignée BL41 traitée versus non traitée montrent :

1. une translocation de p53 vers le noyau
2. la présence d'agrégats de STAT1 et de c-Abl1 dans le noyau

Des expériences de double ou triple marquage et des expériences de FRET permettraient de co-localiser les 3 partenaires et de confirmer ainsi les résultats obtenus antérieurement. Mais les expériences de FRET sont techniquement difficiles à mettre au point, car elles impliquent des protéines modifiées pour lesquelles, il n'est pas certain que les propriétés fonctionnelles soient conservées.

De plus, nous traiterons les cellules transfectées par les différentes constructions de p53 par la Leptomycin B (LMB), inhibiteur de l'exportine CRM1 qui en se liant aux séquences NES permet l'export nucléaire des protéines. Cette expérience va nous permettre de répondre à plusieurs questions, à savoir si la séquestration de p53 dans le noyau et si l'inhibition de l'export nucléaire de c-Abl qu'on voit clairement dans la Figure 5 (article 3) va inverser l'activation de STAT1. Nous comptons également générer un mutant STAT1 délété en sa séquence de localisation nucléaire NLS qui sera séquestré dans le cytosol. L'association de

l'expression de ce variant de STAT1 avec la séquestration des autres protéines p53, c-Abl et ATM dans le noyau induite par le traitement par la Leptomycin B, pourrait d'une part confirmer notre modèle et d'autre part nous indiquer la fonctionnalité de chaque partenaire protéique impliqué dans cette étude, en fonction de sa localisation.

5. Coopération entre p53 et STAT1 au plan fonctionnel

Du point de vue fonctionnel, les deux voies induites séparément par p53 et STAT1 sont pro-apoptotiques. Des études récentes ont mis en évidence une synergie entre l'IFN γ et la Doxorubicine dans l'induction de l'apoptose (Zhu et al., 2007, Thomas et al., 2004). L'étude menée par Taniguchi et al a montré que l'IFN α et l'IFN γ peuvent agir à de faibles doses et induire l'activation de STAT1 (Taniguchi et al., 2001). Nos résultats montrent que la Doxorubicine sensibilise les cellules, dont le p53 est muté, à l'apoptose induite par des doses limites d'IFN.

Cette étude suggère que STAT1 jouerait un rôle dans l'induction de l'apoptose induite par un stress cellulaire dans les cellules où la voie p53 est inactive.

Il a été souvent montré en clinique que les tumeurs résistantes possédaient le plus souvent une p53 mutée. Toutefois, comme la survenue des mutations de p53 est un phénomène relativement tardif dans l'oncogenèse, le développement des mécanismes généraux de résistance à la mort cellulaire peut être initialement indépendante des mutations de p53.

L'existence d'une p53 fonctionnelle n'est pas toujours une condition déterminante de l'activité des médicaments anticancéreux dans les cancers, et les mutations de p53 ne contribuent à la résistance que dans des cas bien définis (Résistance à la Fludarabine*). L'apoptose utilise de nombreuses voies qui sont généralement interconnectées et redondantes et dont l'importance relative dépend du tissu d'origine et des caractéristiques de la tumeur. Comme exemple de voies inter-connectées, des études ont mis en évidence une synergie entre l'IFN γ et d'autres facteurs comme le TNF α et les agents anticancéreux dans l'induction de l'apoptose (Battle et al., 2002, Ohmori et al., 1997).

L'IFN α est utilisé dans le traitement de certains cancers, mais son utilisation est limitée. La compréhension des synergies entre la voie STAT1 et les autres voies pro-apoptotiques pourrait être utile pour le traitement de cancers. Un des meilleurs candidats pour l'étude de ces synergies p53 indépendantes et dépendantes dans l'induction de l'apoptose est le facteur de transcription IRF1, dont le gène est une cible de STAT1.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de répondre à quelques questions concernant la contribution de p53 et STAT1 dans la régulation de Fas dans les cellules infectées par l'EBV ainsi que la relation structurelle et fonctionnelle entre p53 et STAT1 dans un contexte génotoxique.

De part leur fonction pro-apoptotique, les facteurs de transcription STAT1 et p53 sont fortement régulés dans les cellules infectées par l'EBV. Dans notre modèle cellulaire EBV+, l'activation de STAT1 et de p53 par la protéine virale LMP1 est secondaire à NF- κ B. Ce dernier induit l'expression des interférons qui vont activer à leur tour STAT1. L'activation de STAT1 dans ce cas est due à une boucle autocrine initiée par NF- κ B et qui aboutit à l'activation constitutive de STAT1.

Nous avons montré que l'activation de ces trois facteurs de transcription p53, STAT1 et NF- κ B régulent l'expression de Fas à la surface des cellules infectées par l'EBV. La surexpression des facteurs STAT1, p53 induit la surexpression de la protéine pro-apoptotique Fas conduisant à sensibiliser les cellules infectées par l'EBV à l'apoptose médiée par Fas. Ainsi, par l'intermédiaire de sa protéine transformante LMP1, l'EBV sensibilise les cellules à l'apoptose induite par les cellules T cytotoxiques. *In vivo*, ce processus permettrait l'élimination des cellules infectées par le système immunitaire. Ainsi, selon le contexte, la cellule infectée par l'EBV peut soit mourir (rôle de Fas, STAT1, p53), soit devenir cancéreuse (rôle de NF- κ B, Feuillard et al., 2000). Dans ce contexte, l'activation de p53, STAT1 et de CD95 par l'EBV est interprétée comme une pré-sensibilisation de la cellule infectée à la mort cellulaire induite par les cellules T cytotoxiques. Et nous proposons que LMP1 soit un oncogène ambivalent, à l'exemple de certains oncogènes cellulaires.

Le travail réalisé sur des cellules EBV- a montré que l'activation de STAT1 par des agents anticancéreux correspond à un mécanisme nouveau dépendant de la présence de la protéine p53 et impliquant la tyrosine kinase c-Abl1. Des expériences de régulation négative de p53 ainsi que la restauration de l'expression de p53 dans la lignée HL60 déficientes en p53 nous ont permis de confirmer le rôle de p53 dans l'activation de STAT1. Nous avons également démontré que STAT1, p53 et c-Abl interagissent physiquement au minimum deux par deux.

Les proportions du ou des complexes augmentent considérablement après traitement des cellules par la Doxorubicine. STAT1 interagit également avec ATM. L'utilisation de divers variants structurels de p53 a montré que le domaine central de p53 est indispensable pour l'activation de STAT1 par c-Abl. L'activation de STAT1 lors d'un stress génotoxique est indépendante de l'activité transcriptionnelle de p53 et implique la présence du domaine central de fixation à l'ADN (DBD). Nous proposons donc un nouveau modèle d'activation de STAT1, tel que ATM joue le rôle de plateforme pour réunir les protéines c-Abl, p53 et STAT1.

Cependant, certaines zones d'ombres demeurent quant à la localisation exacte du complexe et du rôle exact du domaine central de p53, ainsi que la contribution d'ATM. Pour répondre à cette question, nous allons réaliser une série d'expériences portant sur (i) l'utilisation d'inhibiteurs de l'import et export nucléaire (ii) la réalisation d'immunoprécipitation sur des extraits cellulaire nucléaires et cytosoliques provenant des cellules HL60 transfectées par les variants les plus controversés (trunc 291 et trunc 355) puis révéler les protéines p53, STAT1, ATM et c-Abl et enfin (iii) l'utilisation de variants fonctionnels de c-Abl et explorer leur action sur la phosphorylation et l'activation de STAT1.

Au plan fonctionnel, nous avons montré que la Doxorubicine sensibilise les cellules à l'apoptose induite par des doses limites d'IFN γ et α . A court terme, nous comptons tester si l'utilisation de doses limites de Doxorubicine puisse permettre une meilleure synergie dans l'induction de l'apoptose. La leucémie lymphoïde chronique est caractérisée par une accumulation dans le sang de cellules lymphoïdes B de petite taille, positives pour CD5 et exprimant faiblement les Ig de surface. Dans 50 à 60% des cas de LLC, il existe des signes d'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines (Ig), sans mutation, en faveur d'une origine post-centre germinatif ou « mémoire ». Dans les autres cas, qui correspondent aux formes cliniques agressives, les gènes des Ig ne sont pas mutés, ce qui suggérerait une origine à partir d'une cellule B pré-centre germinatif ou naïve (Fais et al., 1998, Hamblin et al., 1999). Dans certains cas de LLC, il y a délétion ou mutation de p53 et ATM ce qui présente un mauvais pronostic pour la survie du patient.

A moyen terme, nous comptons traiter les cellules B provenant de patients à qui on vient de diagnostiquer une leucémie lymphoïde chronique LLC puis explorer l'activation de STAT1 en fonction du statut de p53. Ceci nous permettra de vérifier la présence éventuelle de

connexion entre les deux voies pro-apoptotiques voire des synergies fonctionnelles à faibles doses d'activateurs des deux voies.

La compréhension de la relation exacte entre p53 et STAT1 au plan structurel et fonctionnel permettra à long terme de comprendre leurs rôles dans le contrôle de la prolifération cellulaire de l'apoptose en réponse à un traitement chimiothérapeutique afin de prévoir certaines résistances aux chimiothérapies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaronson, D.S. & Horvath, C.M. (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT, *Science.*, 296(5573), pp. 1653-1655.
- Abraham, R.T. (2003) Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase, *Bioessays.*, 25(7), pp. 627-630.
- Agami, R. & Shaul, Y. (1998) The kinase activity of c-Abl but not v-Abl is potentiated by direct interaction with RFXI, a protein that binds the enhancers of several viruses and cell-cycle regulated genes, *Oncogene.*, 16(14), pp. 1779-1788.
- Agami, R., Blandino, G., Oren, M. & Shaul, Y. (1999) Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis, *Nature.*, 399(6738), pp. 809-813.
- Aggarwal, B.B., Singh, S., LaPushin, R. & Totpal, K. (1995) Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor, *FEBS Lett.*, 364(1), pp. 5-8.
- Agrawal, S., Agarwal, M.L., Chatterjee-Kishore, M., Stark, G.R. & Chisolm, G.M. (2002) Stat1-dependent, p53-independent expression of p21(waf1) modulates oxysterol-induced apoptosis, *Mol Cell Biol.*, 22(7), pp. 1981-1992.
- Ahn, J.H., Park, S.M., Cho, H.S., Lee, M.S., Yoon, J.B., Vilcek, J. & Lee, T.H. (2001) Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression, *J Biol Chem*, 276(50), pp. 47100-47106.
- Alam, A., Cohen, L.Y., Aouad, S. & Sekaly, R.P. (1999) Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells, *J Exp Med*, 190(12), pp. 1879-1890.
- Alarcon-Vargas, D. & Ronai, Z. (2002) p53-Mdm2--the affair that never ends, *Carcinogenesis.*, 23(4), pp. 541-547.
- Alderson, M.R., Armitage, R.J., Maraskovsky, E., Tough, T.W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F. & Lynch, D.H. (1993) Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes, *J Exp Med*, 178(6), pp. 2231-2235.
- Algeciras-Schimmich, A. & Peter, M.E. (2003) Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells, *FEBS Lett.*, 546(2-3), pp. 185-188.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B.C., Murmann, A.E., Burkhardt, J.K. & Peter, M.E. (2002) Molecular ordering of the initial signaling events of CD95, *Mol Cell Biol*, 22(1), pp. 207-220.
- Anderson, M.E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P. & Tegtmeyer, P. (1997) Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation, *Mol Cell Biol.*, 17(11), pp. 6255-6264.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. & Martinou, J.C. (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria, *Biochem J*, 345 Pt 2, pp. 271-278.
- Asso-Bonnet, M., Feuillard, J., Ferreira, V., Bissieres, P., Tarantino, N., Korner, M. & Raphael, M. (1998) Relationship between IkappaBalpha constitutive expression, TNFalpha synthesis, and apoptosis in EBV-infected lymphoblastoid cells, *Oncogene*, 17(12), pp. 1607-1615.
- Atkinson, P.G., Coope, H.J., Rowe, M. & Ley, S.C. (2003) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52, *J Biol Chem*, 278(51), pp. 51134-51142.

- Attardi, L.D., de Vries, A. & Jacks, T. (2004) Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer, *Oncogene.*, 23(4), pp. 973-980.
- Ayed, A., Mulder, F.A., Yi, G.S., Lu, Y., Kay, L.E. & Arrowsmith, C.H. (2001) Latent and active p53 are identical in conformation, *Nat Struct Biol.*, 8(9), pp. 756-760.
- Babcock, G.J. & Thorley-Lawson, D.A. (2000) Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(22), pp. 12250-12255.
- Babcock, G.J., Hochberg, D. & Thorley-Lawson, A.D. (2000) The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell, *Immunity*, 13(4), pp. 497-506.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C. & et al. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome, *Nature*, 310(5974), pp. 207-211.
- Baichwal, V.R. & Sugden, B. (1988) Latency comes of age for herpesviruses, *Cell*, 52(6), pp. 787-789.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L. & Wiman, K.G. (1995) p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain, *Nucleic Acids Res.*, 23(3), pp. 362-369.
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, *Nature.*, 421(6922), pp. 499-506.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu Rev Immunol*, 14, pp. 649-683.
- Bandobashi, K., Maeda, A., Teramoto, N., Nagy, N., Szekely, L., Taguchi, H., Miyoshi, I., Klein, G. & Klein, E. (2001) Intranuclear localization of the transcription coadaptor CBP/p300 and the transcription factor RBP-Jk in relation to EBNA-2 and -5 in B lymphocytes, *Virology.*, 288(2), pp. 275-282.
- Baran-Marszak, F., Feuillard, J., Najjar, I., Le Clorennec, C., Bechet, J.M., Dusanter-Fourt, I., Bornkamm, G.W., Raphael, M. & Fagard, R. (2004) Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells, *Blood*, 104(8), pp. 2475-2483. Epub 2004 Jun 2424.
- Bargonetti, J. & Manfredi, J.J. (2002) Multiple roles of the tumor suppressor p53, *Curr Opin Oncol.*, 14(1), pp. 86-91.
- Barkett, M. & Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene.*, 18(49), pp. 6910-6924.
- Baskaran, R., Wood, L.D., Whitaker, L.L., Canman, C.E., Morgan, S.E., Xu, Y., Barlow, C., Baltimore, D., Wynshaw-Boris, A., Kastan, M.B. & Wang, J.Y. (1997) Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation, *Nature*, 387(6632), pp. 516-519.
- Baskiewicz-Masiuk, M., Masiuk, M., Czajka, R. & Machalinski, B. (2003) The role of STAT5 proteins in the regulation of normal hematopoiesis in a cord blood model, *Cell Mol Biol Lett.*, 8(2), pp. 317-331.
- Battle, T.E. & Frank, D.A. (2002) The role of STATs in apoptosis, *Curr Mol Med.*, 2(4), pp. 381-392.
- Bayle, J.H., Elenbaas, B. & Levine, A.J. (1995) The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(12), pp. 5729-5733.

- Becker, S., Groner, B. & Muller, C.W. (1998) Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA, *Nature.*, 394(6689), pp. 145-151.
- Behrmann, I., Walczak, H. & Krammer, P.H. (1994) Structure of the human APO-1 gene, *Eur J Immunol*, 24(12), pp. 3057-3062.
- Benard, J., Douc-Rasy, S. & Ahomadegbe, J.C. (2003) TP53 family members and human cancers, *Hum Mutat.*, 21(3), pp. 182-191.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R. & Weissberg, P. (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis, *Science.*, 282(5387), pp. 290-293.
- Bentires-Alj, M., Dejjardin, E., Viatour, P., Van Lint, C., Froesch, B., Reed, J.C., Merville, M.P. & Bours, V. (2001) Inhibition of the NF-kappa B transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines, *Oncogene.*, 20(22), pp. 2805-2813.
- Ben-Yehoyada, M., Ben-Dor, I. & Shaul, Y. (2003) c-Abl tyrosine kinase selectively regulates p73 nuclear matrix association, *J Biol Chem.*, 278(36), pp. 34475-34482. Epub 32003 Jun 34424.
- Beretta, L., Gabbay, M., Berger, R., Hanash, S.M. & Sonenberg, N. (1996) Expression of the protein kinase PKR in modulated by IRF-1 and is reduced in 5q- associated leukemias, *Oncogene.*, 12(7), pp. 1593-1596.
- Bergamaschi, D., Samuels, Y., Jin, B., Duraisingham, S., Crook, T. & Lu, X. (2004) ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members, *Mol Cell Biol.*, 24(3), pp. 1341-1350.
- Bergamaschi, D., Samuels, Y., O'Neil, N.J., Trigiante, G., Crook, T., Hsieh, J.K., O'Connor, D.J., Zhong, S., Campargue, I., Tomlinson, M.L., Kuwabara, P.E. & Lu, X. (2003) iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human, *Nat Genet.*, 33(2), pp. 162-167. Epub 2003 Jan 2013.
- Bergamaschi, D., Samuels, Y., Sullivan, A., Zvelebil, M., Breysens, H., Bisso, A., Del Sal, G., Syed, N., Smith, P., Gasco, M., Crook, T. & Lu, X. (2006) iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53, *Nat Genet.*, 38(10), pp. 1133-1141.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J. & Lima, C.D. (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1, *Cell.*, 108(3), pp. 345-356.
- Bicknell, G.R. & Cohen, G.M. (1995) Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*, 207(1), pp. 40-47.
- Bissonnette, N., Wasylyk, B. & Hunting, D.J. (1997) The apoptotic and transcriptional transactivation activities of p53 can be dissociated, *Biochem Cell Biol.*, 75(4), pp. 351-358.
- Blint, E., Phillips, A.C., Kozlov, S., Stewart, C.L. & Vousden, K.H. (2002) Induction of p57(KIP2) expression by p73beta, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(6), pp. 3529-3534. Epub 2002 Mar 3512.
- Boatright, K.M. & Salvesen, G.S. (2003) Mechanisms of caspase activation, *Curr Opin Cell Biol*, 15(6), pp. 725-731.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R.D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H. & Feuillard, J. (2005) Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system, *Nucleic Acids Res*, 33(16), pp. e137.
- Borza, C.M. & Hutt-Fletcher, L.M. (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus, *Nat Med*, 8(6), pp. 594-599.

- Bosotti, R., Isacchi, A. & Sonnhhammer, E.L. (2000) FAT: a novel domain in PIK-related kinases, *Trends Biochem Sci.*, 25(5), pp. 225-227.
- Bottger, V., Bottger, A., Garcia-Echeverria, C., Ramos, Y.F., van der Eb, A.J., Jochemsen, A.G. & Lane, D.P. (1999) Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces, *Oncogene.*, 18(1), pp. 189-199.
- Bouchard, V.J., Rouleau, M. & Poirier, G.G. (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage, *Exp Hematol.*, 31(6), pp. 446-454.
- Bouker, K.B., Skaar, T.C., Riggins, R.B., Harburger, D.S., Fernandez, D.R., Zwart, A., Wang, A. & Clarke, R. (2005) Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) exhibits tumor suppressor activities in breast cancer associated with caspase activation and induction of apoptosis, *Carcinogenesis.*, 26(9), pp. 1527-1535. Epub 2005 May 1525.
- Boulton, J., Fidler, C., Lewis, S., MacCarthy, A., Sheridan, H., Kelly, S., Oscier, D., Buckle, V.J. & Wainscoat, J.S. (1993) Allelic loss of IRF1 in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: retention of IRF1 on the 5q- chromosome in some patients with the 5q- syndrome, *Blood.*, 82(9), pp. 2611-2616.
- Bourdon, J.C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J.C., Dessen, P., May, P., Debuire, B. & May, E. (1997) Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53, *Oncogene.*, 14(1), pp. 85-94.
- Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K. & Lane, D.P. (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity, *Genes Dev.*, 19(18), pp. 2122-2137. Epub 2005 Aug 2130.
- Boyce, M., Degterev, A. & Yuan, J. (2004) Caspases: an ancient cellular sword of Damocles, *Cell Death Differ.*, 11(1), pp. 29-37.
- Brancolini, C., Sgorbissa, A. & Schneider, C. (1998) Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis, *Cell Death Differ.*, 5(12), pp. 1042-1050.
- Brennan, P., Floettmann, J.E., Mehl, A., Jones, M. & Rowe, M. (2001) Mechanism of action of a novel latent membrane protein-1 dominant negative, *J Biol Chem*, 276(2), pp. 1195-1203.
- Brewster, F.E. & Sullivan, J.L. (1983) Epstein-Barr virus-infected B lymphoblastoid cell lines: dynamics of interferon and 2'5'-oligoadenylate synthetase activity, *Antiviral Res.*, 3(3), pp. 195-209.
- Briscoe, J., Guschin, D., Rogers, N.C., Watling, D., Muller, M., Horn, F., Heinrich, P., Stark, G.R. & Kerr, I.M. (1996a) JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 351(1336), pp. 167-171.
- Briscoe, J., Kohlhuber, F. & Muller, M. (1996b) JAKs and STATs branch out, *Trends Cell Biol.*, 6(9), pp. 336-340.
- Briscoe, J., Rogers, N.C., Witthuhn, B.A., Watling, D., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Stark, G.R., Ihle, J.N. & Kerr, I.M. (1996c) Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state, *Embo J.*, 15(4), pp. 799-809.
- Bromberg, J. & Darnell, J.E., Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function, *Oncogene*, 19(21), pp. 2468-2473.
- Bromberg, J. (2002) Stat proteins and oncogenesis, *J Clin Invest*, 109(9), pp. 1139-1142.
- Brooks, C.L. & Gu, W. (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond, *Mol Cell.*, 21(3), pp. 307-315.
- Brown, G.C. & Borutaite, V. (2001) Nitric oxide, mitochondria, and cell death, *IUBMB Life.*, 52(3-5), pp. 189-195.

- Brown, H.J., Song, M.J., Deng, H., Wu, T.T., Cheng, G. & Sun, R. (2003) NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication, *J Virol*, 77(15), pp. 8532-8540.
- Brown, K.D., Hostager, B.S. & Bishop, G.A. (2002) Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation, *J Biol Chem*, 277(22), pp. 19433-19438.
- Brown, K.D., Ziv, Y., Sadanandan, S.N., Chessa, L., Collins, F.S., Shiloh, Y. & Tagle, D.A. (1997) The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(5), pp. 1840-1845.
- Brune, B. & Schneiderhan, N. (2003) Nitric oxide evoked p53-accumulation and apoptosis, *Toxicol Lett.*, 139(2-3), pp. 119-123.
- Buchberg, A.M., Bedigian, H.G., Taylor, B.A., Brownell, E., Ihle, J.N., Nagata, S., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. (1988) Localization of Evi-2 to chromosome 11: linkage to other proto-oncogene and growth factor loci using interspecific backcross mice, *Oncogene Res.*, 2(2), pp. 149-165.
- Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P. & et al. (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35, *Science*, 269(5232), pp. 1885-1888.
- Butler, J.S. & Loh, S.N. (2005) Kinetic partitioning during folding of the p53 DNA binding domain, *J Mol Biol.*, 350(5), pp. 906-918.
- Caelles, C., Helmberg, A. & Karin, M. (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes, *Nature.*, 370(6486), pp. 220-223.
- Cahir McFarland, E.D., Izumi, K.M. & Mosialos, G. (1999) Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB, *Oncogene*, 18(49), pp. 6959-6964.
- Cahir-McFarland, E.D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltneane, J.M., Henrickson, S.E., Staudt, L.M. & Kieff, E. (2004) Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells, *J Virol*, 78(8), pp. 4108-4119.
- Cahir-McFarland, E.D., Davidson, D.M., Schauer, S.L., Duong, J. & Kieff, E. (2000) NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), pp. 6055-6060.
- Cain, C., Miller, S., Ahn, J. & Prives, C. (2000) The N terminus of p53 regulates its dissociation from DNA, *J Biol Chem.*, 275(51), pp. 39944-39953.
- Calbo, J., Parreno, M., Sotillo, E., Yong, T., Mazo, A., Garriga, J. & Grana, X. (2002) G1 cyclin/cyclin-dependent kinase-coordinated phosphorylation of endogenous pocket proteins differentially regulates their interactions with E2F4 and E2F1 and gene expression, *J Biol Chem*, 277(52), pp. 50263-50274.
- Campbell, K.J., Rocha, S. & Perkins, N.D. (2004) Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B, *Mol Cell*, 13(6), pp. 853-865.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation, *Science*, 282(5392), pp. 1318-1321.
- Carlesso, N., Frank, D.A. & Griffin, J.D. (1996) Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl, *J Exp Med*, 183(3), pp. 811-820.
- Carter, K.L., Cahir-McFarland, E. & Kieff, E. (2002) Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression, *J Virol.*, 76(20), pp. 10427-10436.
- Carvajal, D., Tovar, C., Yang, H., Vu, B.T., Heimbrook, D.C. & Vassilev, L.T. (2005) Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors, *Cancer Res.*, 65(5), pp. 1918-1924.

- Cerosaletti, K., Wright, J. & Concannon, P. (2006) Active role for nibrin in the kinetics of atm activation, *Mol Cell Biol.*, 26(5), pp. 1691-1699.
- Cesarman, E. (2002) Epstein-Barr virus (EBV) and lymphomagenesis, *Front Biosci*, 7, pp. e58-65.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage, *Nature.*, 401(6753), pp. 616-620.
- Chang, H.Y., Yang, X. & Baltimore, D. (1999) Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(4), pp. 1252-1256.
- Chao, C., Saito, S., Kang, J., Anderson, C.W., Appella, E. & Xu, Y. (2000) p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage, *Embo J.*, 19(18), pp. 4967-4975.
- Chatterjee-Kishore, M., Wright, K.L., Ting, J.P. & Stark, G.R. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene, *Embo J.*, 19(15), pp. 4111-4122.
- Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J. & Hood, L. (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway, *Immunity*, 7(6), pp. 821-830.
- Chen, B.P., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Lobrich, M., Shiloh, Y. & Chen, D.J. (2007) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break, *J Biol Chem.*, 282(9), pp. 6582-6587. Epub 2006 Dec 6521.
- Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J. & Gu, W. (2005) ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor, *Cell.*, 121(7), pp. 1071-1083.
- Chen, H., Lee, J.M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M.H., Ambinder, R.F. & Hayward, S.D. (2001) Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors, *J Virol*, 75(6), pp. 2929-2937.
- Chen, J., Lin, J. & Levine, A.J. (1995) Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene, *Mol Med.*, 1(2), pp. 142-152.
- Chen, S., Paul, P. & Price, B.D. (2003) ATM's leucine-rich domain and adjacent sequences are essential for ATM to regulate the DNA damage response, *Oncogene.*, 22(41), pp. 6332-6339.
- Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L. & Prives, C. (1996) p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells, *Genes Dev.*, 10(19), pp. 2438-2451.
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J.E., Jr. & Kuriyan, J. (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA, *Cell.*, 93(5), pp. 827-839.
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. & Hardwick, J.M. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases, *Science*, 278(5345), pp. 1966-1968.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J.P., Brauer, M.J., Kiefer, M.C., Barr, P.J. & Mountz, J.D. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule, *Science*, 263(5154), pp. 1759-1762.
- Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y. & Fu, X.Y. (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1, *Science.*, 272(5262), pp. 719-722.
- Choi, J. & Donehower, L.A. (1999) p53 in embryonic development: maintaining a fine balance, *Cell Mol Life Sci.*, 55(1), pp. 38-47.

- Choudhury, G.G., Ghosh-Choudhury, N. & Abboud, H.E. (1998) Association and direct activation of signal transducer and activator of transcription α by platelet-derived growth factor receptor, *J Clin Invest.*, 101(12), pp. 2751-2760.
- Chowdary, D.R., Dermody, J.J., Jha, K.K. & Ozer, H.L. (1994) Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway, *Mol Cell Biol.*, 14(3), pp. 1997-2003.
- Chuikov, S., Kurash, J.K., Wilson, J.R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G.S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S.J., Barlev, N.A. & Reinberg, D. (2004) Regulation of p53 activity through lysine methylation, *Nature.*, 432(7015), pp. 353-360. Epub 2004 Nov 2003.
- Coccia, E.M., Del Russo, N., Stellacci, E., Orsatti, R., Benedetti, E., Marziali, G., Hiscott, J. & Battistini, A. (1999) Activation and repression of the 2-5A synthetase and p21 gene promoters by IRF-1 and IRF-2, *Oncogene.*, 18(12), pp. 2129-2137.
- Cook, W.D., Metcalf, D., Nicola, N.A., Burgess, A.W. & Walker, F. (1985) Malignant transformation of a growth factor-dependent myeloid cell line by Abelson virus without evidence of an autocrine mechanism, *Cell.*, 41(3), pp. 677-683.
- Coqueret, O. (2002) Linking cyclins to transcriptional control, *Gene*, 299(1-2), pp. 35-55.
- Coqueret, O. (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.*, 13(2), pp. 65-70.
- Cory, S., Huang, D.C. & Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis, *Oncogene*, 22(53), pp. 8590-8607.
- Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P.A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., Balsano, C. & Levrero, M. (2002) DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes, *Mol Cell.*, 9(1), pp. 175-186.
- Courtois, S., de Fromental, C.C. & Hainaut, P. (2004) p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms, *Oncogene.*, 23(3), pp. 631-638.
- Courtois, S., Verhaegh, G., North, S., Luciani, M.G., Lassus, P., Hibner, U., Oren, M. & Hainaut, P. (2002) DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53, *Oncogene.*, 21(44), pp. 6722-6728.
- Curtin, J.F. & Cotter, T.G. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis, *Cell Signal.*, 15(11), pp. 983-992.
- Dai, Z. & Pendergast, A.M. (1995) Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity, *Genes Dev.*, 9(21), pp. 2569-2582.
- Dan, S., Naito, M., Seimiya, H., Kizaki, A., Mashima, T. & Tsuruo, T. (1999) Activation of c-Abl tyrosine kinase requires caspase activation and is not involved in JNK/SAPK activation during apoptosis of human monocytic leukemia U937 cells, *Oncogene.*, 18(6), pp. 1277-1283.
- Danial, N.N. & Rothman, P. (2000) JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes, *Oncogene.*, 19(21), pp. 2523-2531.
- Dantzer, F., Bjoras, M., Luna, L., Klungland, A. & Seeberg, E. (2003) Comparative analysis of 8-oxoG:C, 8-oxoG:A, A:C and C:C DNA repair in extracts from wild type or 8-oxoG DNA glycosylase deficient mammalian and bacterial cells, *DNA Repair (Amst)*. 2(6), pp. 707-718.
- Dantzer, F., Schreiber, V., Niedergang, C., Trucco, C., Flatter, E., De La Rubia, G., Oliver, J., Rolli, V., Menissier-de Murcia, J. & de Murcia, G. (1999) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair, *Biochimie.*, 81(1-2), pp. 69-75.

- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science*, 264(5164), pp. 1415-1421.
- David-Cordonnier, M.H., Hamdane, M., Bailly, C. & D'Halluin, J.C. (1998) The DNA binding domain of the human c-Abl tyrosine kinase preferentially binds to DNA sequences containing an AAC motif and to distorted DNA structures, *Biochemistry*, 37(17), pp. 6065-6076.
- Davis, R.E., Brown, K.D., Siebenlist, U. & Staudt, L.M. (2001) Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells, *J Exp Med.*, 194(12), pp. 1861-1874.
- de Graaf, P., Little, N.A., Ramos, Y.F., Meulmeester, E., Letteboer, S.J. & Jochemsen, A.G. (2003) Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2, *J Biol Chem.*, 278(40), pp. 38315-38324. Epub 32003 Jul 38321.
- de Jager, M., Wyman, C., van Gent, D.C. & Kanaar, R. (2002) DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP, *Nucleic Acids Res.*, 30(20), pp. 4425-4431.
- De Paoli, P., Cozzi, M., Tedeschi, R., Gloghini, A., Cilia, A.M., van Kooten, C., Gaidano, G. & Carbone, A. (1997) High CD40 membrane expression in AIDS-related lymphoma B cell lines is associated with the CD45RA+, CD45RO+, CD95+ phenotype and high levels of its soluble form in culture supernatants, *Cytometry*, 30(1), pp. 33-38.
- Deb, D.K., Sassano, A., Lekmine, F., Majchrzak, B., Verma, A., Kambhampati, S., Uddin, S., Rahman, A., Fish, E.N. & Plataniias, L.C. (2003) Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma, *J Immunol.*, 171(1), pp. 267-273.
- Deb, S.P. (2002) Function and dysfunction of the human oncoprotein MDM2, *Front Biosci.*, 7, pp. d235-243.
- Decker, T., Muller, M. & Stockinger, S. (2005) The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection, *Nat Rev Immunol.*, 5(9), pp. 675-687.
- Delmas, D., Rebe, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Cherkaoui-Malki, M., Jannin, B., Dubrez-Daloz, L., Latruffe, N. & Solary, E. (2003) Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells, *J Biol Chem*, 278(42), pp. 41482-41490.
- Denicourt, C. & Dowdy, S.F. (2004) Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors, *Genes Dev.*, 18(8), pp. 851-855.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E. & Mosialos, G. (1996) Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation, *Mol Cell Biol*, 16(12), pp. 7098-7108.
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B. & Hammerschmidt, W. (2005) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis, *Oncogene*, 24(10), pp. 1711-1717.
- Doll, R. & Peto, R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J Natl Cancer Inst*, 66(6), pp. 1191-1308.
- Donehower, L.A. (1996) The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies, *Semin Cancer Biol.*, 7(5), pp. 269-278.
- Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A.J. & Hupp, T.R. (2003a) The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53, *Mol Cell Biol.*, 23(23), pp. 8846-8861.

- Dornan, D., Shimizu, H., Perkins, N.D. & Hupp, T.R. (2003b) DNA-dependent acetylation of p53 by the transcription coactivator p300, *J Biol Chem.*, 278(15), pp. 13431-13441.
- Dumaz, N. & Meek, D.W. (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2, *Embo J.*, 18(24), pp. 7002-7010.
- Durandy, A., Le Deist, F., Emile, J.F., Debatin, K. & Fischer, A. (1997) Sensitivity of Epstein-Barr virus-induced B cell tumor to apoptosis mediated by anti-CD95/Apo-1/fas antibody, *Eur J Immunol*, 27(2), pp. 538-543.
- Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C. & Levy, D.E. (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease, *Cell.*, 84(3), pp. 443-450.
- Durocher, D. & Jackson, S.P. (2001) DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol.*, 13(2), pp. 225-231.
- Eason, D.D., Shepherd, A.T. & Blanck, G. (1999) Interferon regulatory factor 1 tryptophan 11 to arginine point mutation abolishes DNA binding, *Biochim Biophys Acta.*, 1446(1-2), pp. 140-144.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y. & et al. (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis, *Cancer Res.*, 54(5), pp. 1169-1174.
- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53, *Nat Genet.*, 1(1), pp. 45-49.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell*, 75(4), pp. 817-825.
- Eliopoulos, A.G. & Young, L.S. (1998) Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1), *Oncogene*, 16(13), pp. 1731-1742.
- Eliopoulos, A.G., Davies, C., Blake, S.S., Murray, P., Najafipour, S., Tsihchlis, P.N. & Young, L.S. (2002) The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF-kappaB signaling downstream of TRAF2, *J Virol*, 76(9), pp. 4567-4579.
- Eliopoulos, A.G., Dawson, C.W., Mosialos, G., Floettmann, J.E., Rowe, M., Armitage, R.J., Dawson, J., Zapata, J.M., Kerr, D.J., Wakelam, M.J., Reed, J.C., Kieff, E. & Young, L.S. (1996) CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr Virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator, *Oncogene*, 13(10), pp. 2243-2254.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W. & Young, L.S. (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production, *J Biol Chem*, 274(23), pp. 16085-16096.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. & Oren, M. (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells, *Nature.*, 312(5995), pp. 646-649.
- Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. (1995) Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis, *Nature*, 375(6526), pp. 78-81.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. & Barr, Y.M. (1964) Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma, *Lancet*, 15, pp. 702-703.
- Eramo, A., Sargiacomo, M., Ricci-Vitiani, L., Todaro, M., Stassi, G., Messina, C.G., Parolini, I., Lotti, F., Sette, G., Peschle, C. & De Maria, R. (2004) CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells, *Eur J Immunol.*, 34(7), pp. 1930-1940.

- Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., Labi, V., Niederegger, H., Coultas, L., Adams, J.M., Strasser, A. & Villunger, A. (2005) BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo, *Blood.*, 106(13), pp. 4131-4138. Epub 2005 Aug 4123.
- Erster, S., Mihara, M., Kim, R.H., Petrenko, O. & Moll, U.M. (2004) 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(15), pp. 6728-6741.
- Espert, L., Dusanter-Fourt, I. & Chelbi-Alix, M.K. (2005) [Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis], *Bull Cancer.*, 92(10), pp. 845-857.
- Espinoza, F.H., Farrell, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Morgan, D.O. (1996) A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK, *Science.*, 273(5282), pp. 1714-1717.
- Everly, D.N., Jr., Mainou, B.A. & Raab-Traub, N. (2004) Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation, *J Virol*, 78(24), pp. 13470-13478.
- Fagard, R., Mouas, H., Dusanter-Fourt, I., Devillers, C., Bissieres, P., Martin, A., Lenoir, G., VanTan, H., Feuillard, J. & Raphael, M. (2002) Resistance to fludarabine-induced apoptosis in Epstein-Barr virus infected B cells, *Oncogene*, 21(29), pp. 4473-4480.
- Fagerlund, R., Melen, K., Kinnunen, L. & Julkunen, I. (2002) Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5, *J Biol Chem.*, 277(33), pp. 30072-30078. Epub 32002 Jun 30074.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S.L., Schulman, P., Vinciguerra, V.P., Rai, K., Rassenti, L.Z., Kipps, T.J., Dighiero, G., Schroeder, H.W., Jr., Ferrarini, M. & Chiorazzi, N. (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors, *J Clin Invest.*, 102(8), pp. 1515-1525.
- Falck, J., Lukas, C., Protopopova, M., Lukas, J., Selivanova, G. & Bartek, J. (2001) Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway, *Oncogene.*, 20(39), pp. 5503-5510.
- Falk, M.H., Trauth, B.C., Debatin, K.M., Klas, C., Gregory, C.D., Rickinson, A.B., Calender, A., Lenoir, G.M., Ellwart, J.W., Krammer, P.H. & et al. (1992) Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype, *Blood*, 79(12), pp. 3300-3306.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. & Weissman, A.M. (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53, *J Biol Chem.*, 275(12), pp. 8945-8951.
- Fearon, D.T. & Locksley, R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response, *Science.*, 272(5258), pp. 50-53.
- Fernandes, N., Sun, Y., Chen, S., Paul, P., Shaw, R.J., Cantley, L.C. & Price, B.D. (2005) DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM, *J Biol Chem.*, 280(15), pp. 15158-15164. Epub 12005 Feb 15115.
- Feuillard, J., Gouy, H., Bismuth, G., Lee, L.M., Debre, P. & Korner, M. (1991) NF-kappa B activation by tumor necrosis factor alpha in the Jurkat T cell line is independent of protein kinase A, protein kinase C, and Ca(2+)-regulated kinases, *Cytokine.*, 3(3), pp. 257-265.

- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A. & Fearon, D.T. (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(14), pp. 4510-4514.
- Finlay, C.A. (1992) Normal and malignant growth control by p53, *Cancer Treat Res.*, 63, pp. 327-344.
- Floettmann, J.E. & Rowe, M. (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation, *Oncogene*, 15(15), pp. 1851-1858.
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F. & Jacks, T. (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage, *Nature.*, 416(6880), pp. 560-564.
- Follezou, J.Y., Emerit, J. & Bricaire, F. (1999) [Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis], *Presse Med*, 28(30), pp. 1661-1666.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A. & Jeggo, P. (2003) A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein, *Embo J.*, 22(11), pp. 2860-2871.
- Fraser, H.B., Hirsh, A.E., Steinmetz, L.M., Scharfe, C. & Feldman, M.W. (2002) Evolutionary rate in the protein interaction network, *Science.*, 296(5568), pp. 750-752.
- Freiberg, R.A., Spencer, D.M., Choate, K.A., Duh, H.J., Schreiber, S.L., Crabtree, G.R. & Khavari, P.A. (1997) Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts, *J Invest Dermatol*, 108(2), pp. 215-219.
- Fried, L.M., Koumenis, C., Peterson, S.R., Green, S.L., van Zijl, P., Allalunis-Turner, J., Chen, D.J., Fishel, R., Giaccia, A.J., Brown, J.M. & Kirchgessner, C.U. (1996) The DNA damage response in DNA-dependent protein kinase-deficient SCID mouse cells: replication protein A hyperphosphorylation and p53 induction, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(24), pp. 13825-13830.
- Friedberg, E.C. (1995) Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair, *Trends Biochem Sci.*, 20(10), pp. 381.
- Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C. & Oren, M. (1996) A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis, *Mol Cell Biol.*, 16(9), pp. 4961-4971.
- Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J. & Prives, C. (1993) The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90(8), pp. 3319-3323.
- Fries, K.L., Miller, W.E. & Raab-Traub, N. (1996) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene, *J Virol*, 70(12), pp. 8653-8659.
- Fries, K.L., Miller, W.E. & Raab-Traub, N. (1999) The A20 protein interacts with the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) and alters the LMP1/TRAF1/TRADD complex, *Virology*, 264(1), pp. 159-166.
- Fritsche, M., Haessler, C. & Brandner, G. (1993) Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents, *Oncogene.*, 8(2), pp. 307-318.
- Fu, L., Minden, M.D. & Benchimol, S. (1996) Translational regulation of human p53 gene expression, *Embo J.*, 15(16), pp. 4392-4401.
- Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K. & Kishimoto, T. (1997) Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes, *J Clin Invest.*, 99(12), pp. 2898-2905.

- Fujita, T., Kimura, Y., Miyamoto, M., Barsoumian, E.L. & Taniguchi, T. (1989) Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1, *Nature.*, 337(6204), pp. 270-272.
- Fujita, T., Sakakibara, J., Sudo, Y., Miyamoto, M., Kimura, Y. & Taniguchi, T. (1988) Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements, *Embo J.*, 7(11), pp. 3397-3405.
- Fujiwara, S. & Ono, Y. (1995) Isolation of Epstein-Barr virus-infected clones of the human T-cell line MT-2: use of recombinant viruses with a positive selection marker, *J Virol*, 69(6), pp. 3900-3903.
- Fulda, S., Scaffidi, C., Pietsch, T., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Debatin, K.M. (1998) Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells, *Cell Death Differ*, 5(10), pp. 884-893.
- Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E. & Shay, J.W. (1992) A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes, *Mol Cell Biol.*, 12(6), pp. 2866-2871.
- Gajate, C. & Mollinedo, F. (2001) The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells, *Blood*, 98(13), pp. 3860-3863.
- Gajate, C. & Mollinedo, F. (2005) Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy, *J Biol Chem*, 280(12), pp. 11641-11647.
- Gajate, C. & Mollinedo, F. (2006) Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts, *Blood*.
- Gajate, C., Del Canto-Janez, E., Acuna, A.U., Amat-Guerri, F., Geijo, E., Santos-Beneit, A.M., Veldman, R.J. & Mollinedo, F. (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis, *J Exp Med*, 200(3), pp. 353-365.
- Gajate, C., Santos-Beneit, A.M., Macho, A., Lazaro, M., Hernandez-De Rojas, A., Modolell, M., Munoz, E. & Mollinedo, F. (2000) Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH(3)-induced apoptosis of human leukemic cells, *Int J Cancer*, 86(2), pp. 208-218.
- Gamero, A.M. & Larner, A.C. (2001) Vanadate facilitates interferon alpha-mediated apoptosis that is dependent on the Jak/Stat pathway, *J Biol Chem.*, 276(17), pp. 13547-13553. Epub 12001 Jan 13519.
- Garcia, J.F., Camacho, F.I., Morente, M., Fraga, M., Montalban, C., Alvaro, T., Bellas, C., Castano, A., Diez, A., Flores, T., Martin, C., Martinez, M.A., Mazorra, F., Menarguez, J., Mestre, M.J., Mollejo, M., Saez, A.I., Sanchez, L. & Piris, M.A. (2003) Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays, *Blood*, 101(2), pp. 681-689.
- Garriga, J., Jayaraman, A.L., Limon, A., Jayadeva, G., Sotillo, E., Truongcao, M., Patsialou, A., Wadzinski, B.E. & Grana, X. (2004) A dynamic equilibrium between CDKs and PP2A modulates phosphorylation of pRB, p107 and p130, *Cell Cycle*, 3(10), pp. 1320-1330.
- Gatti, R.A., Berkel, I., Boder, E., Braedt, G., Charmley, P., Concannon, P., Ersoy, F., Foroud, T., Jaspers, N.G., Lange, K. & et al. (1988) Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23, *Nature.*, 336(6199), pp. 577-580.
- Gatz, S.A. & Wiesmuller, L. (2006) p53 in recombination and repair, *Cell Death Differ.*, 13(6), pp. 1003-1016.

- Geyer, R.K., Yu, Z.K. & Maki, C.G. (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export, *Nat Cell Biol.*, 2(9), pp. 569-573.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M. & Hammerschmidt, W. (1999) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins, *Embo J*, 18(11), pp. 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. & Hammerschmidt, W. (1997) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule, *Embo J*, 16(20), pp. 6131-6140.
- Goh, K.I., Oh, E., Jeong, H., Kahng, B. & Kim, D. (2002) Classification of scale-free networks, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(20), pp. 12583-12588. Epub 12002 Sep 12518.
- Goodhead, D.T. (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA, *Int J Radiat Biol.*, 65(1), pp. 7-17.
- Goormachtigh, G., Ouk, T.S., Mougel, A., Tranchand-Bunel, D., Masy, E., Le Clorennec, C., Feuillard, J., Bornkamm, G.W., Auriault, C., Manet, E., Fafeur, V., Adriaenssens, E. & Coll, J. (2006) Autoactivation of the Epstein-Barr virus oncogenic protein LMP1 during type II latency through opposite roles of the NF-kappaB and JNK signaling pathways, *J Virol.*, 80(15), pp. 7382-7393.
- Gordadze, A.V., Peng, R., Tan, J., Liu, G., Sutton, R., Kempkes, B., Bornkamm, G.W. & Ling, P.D. (2001) Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus, *J Virol*, 75(13), pp. 5899-5912.
- Gorlich, D. & Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 15, pp. 607-660.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. & Del Sal, G. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1, *Embo J.*, 18(22), pp. 6462-6471.
- Gouilleux-Gruart, V., Gouilleux, F., Desaint, C., Claisse, J.F., Capiod, J.C., Delobel, J., Weber-Nordt, R., Dusanter-Fourt, I., Dreyfus, F., Groner, B. & Prin, L. (1996) STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients, *Blood.*, 87(5), pp. 1692-1697.
- Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A.J., Jr. & Giaccia, A.J. (1994) Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status, *Mol Cell Biol.*, 14(9), pp. 6264-6277.
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis, *Science*, 281(5381), pp. 1309-1312.
- Green, W.B., Slovak, M.L., Chen, I.M., Pallavicini, M., Hecht, J.L. & Willman, C.L. (1999) Lack of IRF-1 expression in acute promyelocytic leukemia and in a subset of acute myeloid leukemias with del(5)(q31), *Leukemia.*, 13(12), pp. 1960-1971.
- Gregory, C.D., Dive, C., Henderson, S., Smith, C.A., Williams, G.T., Gordon, J. & Rickinson, A.B. (1991) Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis, *Nature*, 349(6310), pp. 612-614.
- Greten, F.R. & Karin, M. (2004) The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer, *Cancer Lett.*, 206(2), pp. 193-199.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T.F., Morris, C.A. & Sturzl, M. (2005) EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX, *Blood*, 105(8), pp. 3263-3269.

- Groux, H., Cottrez, F., Montpellier, C., Quatannens, B., Coll, J., Stehelin, D. & Auriault, C. (1997) Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus, *Blood*, 89(12), pp. 4521-4530.
- Gu, J., Nie, L., Wiederschain, D. & Yuan, Z.M. (2001) Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export, *Mol Cell Biol.*, 21(24), pp. 8533-8546.
- Guan, B., Yue, P., Clayman, G.L. & Sun, S.Y. (2001) Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene, *J Cell Physiol.*, 188(1), pp. 98-105.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W. & Pandolfi, P.P. (2000) The function of PML in p53-dependent apoptosis, *Nat Cell Biol.*, 2(10), pp. 730-736.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G. & Baldwin, A.S., Jr. (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1, *Mol Cell Biol*, 19(8), pp. 5785-5799.
- Hainaut, P. & Hollstein, M. (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations, *Adv Cancer Res.*, 77, pp. 81-137.
- Hainaut, P., Hall, A. & Milner, J. (1994) Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding, *Oncogene.*, 9(1), pp. 299-303.
- Halaby, M.J. & Yang, D.Q. (2007) p53 translational control: a new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics, *Gene.*, 395(1-2), pp. 1-7. Epub 2007 Feb 2016.
- Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S. & Croce, C.M. (1994) Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells, *Cancer Res.*, 54(8), pp. 2095-2097.
- Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs.*, 42(4), pp. 569-605.
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson, F.K. (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia, *Blood.*, 94(6), pp. 1848-1854.
- Hamer, G., Gademan, I.S., Kal, H.B. & de Rooij, D.G. (2001) Role for c-Abl and p73 in the radiation response of male germ cells, *Oncogene.*, 20(32), pp. 4298-4304.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer, *Cell.*, 100(1), pp. 57-70.
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T. & Taniguchi, T. (1989) Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes, *Cell.*, 58(4), pp. 729-739.
- Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M. & Taniguchi, T. (1993) Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2, *Science.*, 259(5097), pp. 971-974.
- Harada, H., Kondo, T., Ogawa, S., Tamura, T., Kitagawa, M., Tanaka, N., Lamphier, M.S., Hirai, H. & Taniguchi, T. (1994) Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia; a possible mechanism of tumor suppressor inactivation, *Oncogene.*, 9(11), pp. 3313-3320.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell.*, 75(4), pp. 805-816.
- Hartwell, L.H., Szankasi, P., Roberts, C.J., Murray, A.W. & Friend, S.H. (1997) Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs, *Science.*, 278(5340), pp. 1064-1068.
- Haspel, R.L. & Darnell, J.E., Jr. (1999) A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(18), pp. 10188-10193.

- Hassin-Baer, S., Bar-Shira, A., Gilad, S., Galanty, Y., Khosravi, R., Lossos, A., Giladi, N., Weitz, R., Ben-Zeev, B., Goldhammer, Y. & Shiloh, Y. (1999) Absence of mutations in ATM, the gene responsible for ataxia telangiectasia in patients with cerebellar ataxia, *J Neurol.*, 246(8), pp. 716-719.
- Haupt, Y. & Oren, M. (1996) p53-mediated apoptosis: mechanisms and regulation, *Behring Inst Mitt.*, (97), pp. 32-59.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*, 387(6630), pp. 296-299.
- Hay, T.J. & Meek, D.W. (2000) Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM2 oncoprotein cluster within two important functional domains, *FEBS Lett.*, 478(1-2), pp. 183-186.
- Hellin, A.C., Bentires-Alj, M., Verlaet, M., Benoit, V., Gielen, J., Bours, V. & Merville, M.P. (2000) Roles of nuclear factor-kappaB, p53, and p21/WAF1 in daunomycin-induced cell cycle arrest and apoptosis, *J Pharmacol Exp Ther.*, 295(3), pp. 870-878.
- Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407(6805), pp. 770-776.
- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Klein, G., Morrow, R.H., Munube, G.M., Pike, P., Tukei, P.M. & Ziegler, J.L. (1969) Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups, *J Natl Cancer Inst*, 43(5), pp. 1147-1157.
- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H. & Henle, G. (1967) Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells, *Science*, 157(792), pp. 1064-1065.
- Henriquez, N.V., Floettmann, E., Salmon, M., Rowe, M. & Rickinson, A.B. (1999) Differential responses to CD40 ligation among Burkitt lymphoma lines that are uniformly responsive to Epstein-Barr virus latent membrane protein 1, *J Immunol*, 162(6), pp. 3298-3307.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression, *Mol Cell.*, 1(1), pp. 3-11.
- Higuchi, M., Kieff, E. & Izumi, K.M. (2002) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines, *J Virol*, 76(1), pp. 455-459.
- Hinds, P., Finlay, C. & Levine, A.J. (1989) Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation, *J Virol.*, 63(2), pp. 739-746.
- Hinz, M., Loser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dorken, B. & Scheidereit, C. (2001) Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Blood.*, 97(9), pp. 2798-2807.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J. & Mak, T.W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2, *Science.*, 287(5459), pp. 1824-1827.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. & Kroemer, G. (1997) The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death, *Oncogene.*, 15(13), pp. 1573-1581.
- Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A.J. & Ott, J. (2002) The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(13), pp. 8467-8472. Epub 2002 Jun 8 19.

- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. & Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines, *Nucleic Acids Res.*, 22(17), pp. 3551-3555.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers, *Science.*, 253(5015), pp. 49-53.
- Honda, R. & Yasuda, H. (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53, *Embo J.*, 18(1), pp. 22-27.
- Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53, *FEBS Lett.*, 420(1), pp. 25-27.
- Hong, F., Jaruga, B., Kim, W.H., Radaeva, S., El-Assal, O.N., Tian, Z., Nguyen, V.A. & Gao, B. (2002) Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: regulation by SOCS, *J Clin Invest.*, 110(10), pp. 1503-1513.
- Horvath, C.M. (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals, *Trends Biochem Sci.*, 25(10), pp. 496-502.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. & Goeddel, D.V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways, *Cell*, 84(2), pp. 299-308.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. & Fesik, S.W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain, *Nature*, 384(6610), pp. 638-641.
- Huang, Y.Q., Li, J.J. & Karparkin, S. (2000) Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway, *J Biol Chem.*, 275(9), pp. 6462-6468.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D. & Rowe, M. (1995) The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain, *Oncogene*, 10(3), pp. 549-560.
- Hupp, T.R. & Lane, D.P. (1994) Allosteric activation of latent p53 tetramers, *Curr Biol.*, 4(10), pp. 865-875.
- Hwang, P.M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T.A., Murphy, M.P., Kelso, G.F., Smith, R.A., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (2001) Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells, *Nat Med.*, 7(10), pp. 1111-1117.
- Igney, F.H. & Krammer, P.H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nat Rev Cancer*, 2(4), pp. 277-288.
- Ihle, J.N. (2001) The Stat family in cytokine signaling, *Curr Opin Cell Biol.*, 13(2), pp. 211-217.
- Iida, K., Nobori, T., Matsumine, A., Isaka, A., Seto, M., Shiraishi, T. & Uchida, A. (2003) Effect of retinoblastoma tumor suppressor gene expression on chemosensitivity of human osteosarcoma cell lines, *Oncol Rep.*, 10(6), pp. 1961-1965.
- Ilaria, R.L., Jr. & Van Etten, R.A. (1996) P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members, *J Biol Chem.*, 271(49), pp. 31704-31710.
- Imada, K. & Leonard, W.J. (2000) The Jak-STAT pathway, *Mol Immunol.*, 37(1-2), pp. 1-11.
- Imbriano, C., Gurtner, A., Cocchiarella, F., Di Agostino, S., Basile, V., Gostissa, M., Dobbstein, M., Del Sal, G., Piaggio, G. & Mantovani, R. (2005) Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters, *Mol Cell Biol.*, 25(9), pp. 3737-3751.
- Innocente, S.A., Abrahamson, J.L., Cogswell, J.P. & Lee, J.M. (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(5), pp. 2147-2152.

- Issing, W.J., Wustrow, T.P., Oeckler, R., Mezger, J. & Nerlich, A. (1993) An association of the RB gene with osteosarcoma: molecular genetic evaluation of a case of hereditary retinoblastoma, *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, 250(5), pp. 277-280.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E. & Yao, T.P. (2002) MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation, *Embo J.*, 21(22), pp. 6236-6245.
- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E. & Yao, T.P. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2, *Embo J.*, 20(6), pp. 1331-1340.
- Izumi, K.M. & Kieff, E.D. (1997) The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23), pp. 12592-12597.
- Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Riley, E.A., Rizzo, D., Chen, Y. & Kieff, E. (1999a) The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation, *J Virol*, 73(12), pp. 9908-9916.
- Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B. & Kieff, E.D. (1999b) The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation, *Mol Cell Biol*, 19(8), pp. 5759-5767.
- Jackson, M.W., Lindstrom, M.S. & Berberich, S.J. (2001) MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation, *J Biol Chem.*, 276(27), pp. 25336-25341. Epub 22001 Apr 25310.
- Jackson, S.P. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis.*, 23(5), pp. 687-696.
- Janjua, S., Stephanou, A. & Latchman, D.S. (2002) The C-terminal activation domain of the STAT-1 transcription factor is necessary and sufficient for stress-induced apoptosis, *Cell Death Differ.*, 9(10), pp. 1140-1146.
- Jansen, R., Lan, N., Qian, J. & Gerstein, M. (2002) Integration of genomic datasets to predict protein complexes in yeast, *J Struct Funct Genomics.*, 2(2), pp. 71-81.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S. & Pavletich, N.P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms, *Science.*, 267(5203), pp. 1498-1502.
- Jeffrey, P.D., Tong, L. & Pavletich, N.P. (2000) Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors, *Genes Dev*, 14(24), pp. 3115-3125.
- Jelaska, A. & Korn, J.H. (1998) Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts, *J Cell Physiol*, 175(1), pp. 19-29.
- Jenkins, J.R., Rudge, K. & Currie, G.A. (1984) Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53, *Nature.*, 312(5995), pp. 651-654.
- Jenner, T.J., Cunniffe, S.M., Stevens, D.L. & O'Neill, P. (1998) Induction of DNA-protein crosslinks in Chinese hamster V79-4 cells exposed to high- and low-linear energy transfer radiation, *Radiat Res.*, 150(5), pp. 593-599.
- Jin, Y.H., Yoo, K.J., Lee, Y.H. & Lee, S.K. (2000) Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells, *J Biol Chem*, 275(39), pp. 30256-30263.

- Jing, Y., Wang, M., Tang, W., Qi, T., Gu, C., Hao, S. & Zeng, X. (2007) c-Abl tyrosine kinase activates p21 transcription via interaction with p53, *J Biochem.*, 141(5), pp. 621-626. Epub 2007 Mar 2004.
- Joerger, A.C. & Fersht, A.R. (2007) Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants, *Oncogene.*, 26(15), pp. 2226-2242.
- John, S., Vinkemeier, U., Soldaini, E., Darnell, J.E., Jr. & Leonard, W.J. (1999) The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5, *Mol Cell Biol.*, 19(3), pp. 1910-1918.
- Joseph, A.M., Babcock, G.J. & Thorley-Lawson, D.A. (2000) Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils, *J Virol*, 74(21), pp. 9964-9971.
- Joyce, D., Albanese, C., Steer, J., Fu, M., Bouzahzah, B. & Pestell, R.G. (2001) NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 12(1), pp. 73-90.
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D.L. & Oren, M. (1993) Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene, *Oncogene.*, 8(12), pp. 3411-3416.
- Kaesler, M.D. & Iggo, R.D. (2002) Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(1), pp. 95-100. Epub 2001 Dec 2026.
- Kahyo, T., Nishida, T. & Yasuda, H. (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53, *Mol Cell.*, 8(3), pp. 713-718.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W. & Kempkes, B. (1999) The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2, *J Virol.*, 73(5), pp. 4481-4484.
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., Le, J., Koh, S.I., Kimura, T., Green, S.J. & et al. (1994) Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages, *Science.*, 263(5153), pp. 1612-1615.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. (1998a) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(14), pp. 8292-8297.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. (1998b) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(14), pp. 8292-8297.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G. & Sherr, C.J. (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF, *Cell.*, 91(5), pp. 649-659.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(13), pp. 7556-7561.
- Karin, M. & Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death, *Nat Immunol*, 3(3), pp. 221-227.
- Kastan, M.B. & Zambetti, G.P. (2003) Parcing p53 in the cytoplasm, *Cell.*, 112(1), pp. 1-2.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res.*, 51(23 Pt 1), pp. 6304-6311.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. & Fornace, A.J., Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell*, 71(4), pp. 587-597.

- Kawai, H., Wiederschain, D. & Yuan, Z.M. (2003) Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination, *Mol Cell Biol.*, 23(14), pp. 4939-4947.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M. & Kieff, E. (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), pp. 9150-9154.
- Kaykas, A. & Sugden, B. (2000) The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation, *Oncogene*, 19(11), pp. 1400-1410.
- Kennedy, N.J., Kataoka, T., Tschopp, J. & Budd, R.C. (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation, *J Exp Med*, 190(12), pp. 1891-1896.
- Keppler, O.T., Peter, M.E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W. & Pawlita, M. (1999) Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus, *Glycobiology*, 9(6), pp. 557-569.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26(4), pp. 239-257.
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T.D., Feller, S.M., Weichselbaum, R.R. & Kufe, D.W. (1995) Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents, *Nature.*, 376(6543), pp. 785-788.
- Khayat, C.M. & Johnston, D.L. (2004) Rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, and adrenocortical carcinoma in a child with a germline p53 mutation, *Pediatr Blood Cancer.*, 43(6), pp. 683-686.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y. & Shkedy, D. (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(26), pp. 14973-14977.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W. & Hammerschmidt, W. (1997) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade, *Embo J*, 16(21), pp. 6478-6485.
- Kim, D.K., Cho, E.S., Lee, S.J. & Um, H.D. (2001) Constitutive hyperexpression of p21(WAF1) in human U266 myeloma cells blocks the lethal signaling induced by oxidative stress but not by Fas, *Biochem Biophys Res Commun.*, 289(1), pp. 34-38.
- Kim, H.S. & Lee, M.S. (2005) Essential role of STAT1 in caspase-independent cell death of activated macrophages through the p38 mitogen-activated protein kinase/STAT1/reactive oxygen species pathway, *Mol Cell Biol.*, 25(15), pp. 6821-6833.
- Kim, H.S. & Lee, M.S. (2007) STAT1 as a key modulator of cell death, *Cell Signal.*, 19(3), pp. 454-465. Epub 2006 Sep 2030.
- Kim, H.S., Chang, I., Kim, J.Y., Choi, K.H. & Lee, M.S. (2005) Caspase-mediated p65 cleavage promotes TRAIL-induced apoptosis, *Cancer Res.*, 65(14), pp. 6111-6119.
- Kim, K.I., Yan, M., Malakhova, O., Luo, J.K., Shen, M.F., Zou, W., de la Torre, J.C. & Zhang, D.E. (2006) Ube1L and protein ISGylation are not essential for alpha/beta interferon signaling, *Mol Cell Biol.*, 26(2), pp. 472-479.
- Kim, P.K., Armstrong, M., Liu, Y., Yan, P., Bucher, B., Zuckerbraun, B.S., Gambotto, A., Billiar, T.R. & Yim, J.H. (2004) IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo, *Oncogene.*, 23(5), pp. 1125-1135.
- Kim, T.K. & Maniatis, T. (1996) Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway, *Science.*, 273(5282), pp. 1717-1719.
- Kimura, M., Haisa, M., Uetsuka, H., Takaoka, M., Ohkawa, T., Kawashima, R., Yamatsuji, T., Gunduz, M., Kaneda, Y., Tanaka, N. & Naomoto, Y. (2003) TNF combined with

- IFN-alpha accelerates NF-kappaB-mediated apoptosis through enhancement of Fas expression in colon cancer cells, *Cell Death Differ.*, 10(6), pp. 718-728.
- Kimura, T., Nakayama, K., Penninger, J., Kitagawa, M., Harada, H., Matsuyama, T., Tanaka, N., Kamijo, R., Vilcek, J., Mak, T.W. & et al. (1994) Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons, *Science.*, 264(5167), pp. 1921-1924.
- Kirch, H.C., Flaswinkel, S., Rumpf, H., Brockmann, D. & Esche, H. (1999) Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF-kappaB and Myc/Max, *Oncogene*, 18(17), pp. 2728-2738.
- Kirchhoff, S. & Hauser, H. (1999) Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis, *Oncogene.*, 18(25), pp. 3725-3736.
- Kirchhoff, S., Koromilas, A.E., Schaper, F., Grashoff, M., Sonenberg, N. & Hauser, H. (1995) IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR, *Oncogene.*, 11(3), pp. 439-445.
- Kirchhoff, S., Schaper, F. & Hauser, H. (1993) Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes, *Nucleic Acids Res.*, 21(12), pp. 2881-2889.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275(5303), pp. 1132-1136.
- Kobayashi, J., Antocchia, A., Tauchi, H., Matsuura, S. & Komatsu, K. (2004) NBS1 and its functional role in the DNA damage response, *DNA Repair (Amst)*. 3(8-9), pp. 855-861.
- Koenig, U., Eckhart, L. & Tschachler, E. (2001) Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene, *Biochem Biophys Res Commun*, 285(5), pp. 1150-1154.
- Kofoed, E.M., Hwa, V., Little, B., Woods, K.A., Buckway, C.K., Tsubaki, J., Pratt, K.L., Bezrodnik, L., Jasper, H., Tepper, A., Heinrich, J.J. & Rosenfeld, R.G. (2003) Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation, *N Engl J Med.*, 349(12), pp. 1139-1147.
- Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Wang, K., Christov, K., Golovkina, T.V., Goldblum, J.R. & Gudkov, A.V. (2004) Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice, *Oncogene.*, 23(19), pp. 3265-3271.
- Kondo, T., Minamino, N., Nagamura-Inoue, T., Matsumoto, M., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (1997) Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity, *Oncogene.*, 15(11), pp. 1275-1281.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions, *Science.*, 279(5351), pp. 703-707.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. & Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis, *Science*, 278(5336), pp. 294-298.
- Kramer, A. & Ho, A.D. (2001) Centrosome aberrations and cancer, *Onkologie.*, 24(6), pp. 538-544.
- Kramer, O.H., Baus, D., Knauer, S.K., Stein, S., Jager, E., Stauber, R.H., Grez, M., Pfitzner, E. & Heinzl, T. (2006) Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity, *Genes Dev.*, 20(4), pp. 473-485.

- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system, *Nature*, 407(6805), pp. 789-795.
- Krauer, K.G., Buck, M. & Sculley, T. (1999) Characterization of the transcriptional repressor RBP in Epstein-Barr virus-transformed B cells, *J Gen Virol*, 80 (Pt 12), pp. 3217-3226.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. & Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2, *Nature*, 387(6630), pp. 299-303.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V. & Raab-Traub, N. (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), pp. 11963-11968.
- Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T.W., Horvath, C.M. & Stark, G.R. (1997) Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases, *Science*, 278(5343), pp. 1630-1632.
- Lacour, S., Hammann, A., Grazide, S., Lagadic-Gossman, D., Athias, A., Sergent, O., Laurent, G., Gambert, P., Solary, E. & Dimanche-Boitrel, M.T. (2004) Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells, *Cancer Res*, 64(10), pp. 3593-3598.
- Laherty, C.D., Hu, H.M., Opipari, A.W., Wang, F. & Dixit, V.M. (1992) The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B, *J Biol Chem*, 267(34), pp. 24157-24160.
- Lamkanfi, M., Kalai, M. & Vandenabeele, P. (2004) Caspase-12: an overview, *Cell Death Differ*, 11(4), pp. 365-368.
- Lane, D.P. & Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells, *Nature*, 278(5701), pp. 261-263.
- Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., El-Naggar, A.K. & Lozano, G. (2004) Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome, *Cell*, 119(6), pp. 861-872.
- Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D. & Gosselin, J. (1998) Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils, *Blood*, 92(1), pp. 291-299.
- Lasfer, M., Davenne, L., Vadrot, N., Alexia, C., Sadj-Ouatas, Z., Bringuier, A.F., Feldmann, G., Pessayre, D. & Reyl-Desmars, F. (2006) Protein kinase PKC delta and c-Abl are required for mitochondrial apoptosis induction by genotoxic stress in the absence of p53, p73 and Fas receptor, *FEBS Lett.*, 580(11), pp. 2547-2552. Epub 2006 Apr 2512.
- Lavrik, I.N., Golks, A. & Krammer, P.H. (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death, *J Clin Invest.*, 115(10), pp. 2665-2672.
- Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G.W. & Feuillard, J. (2006) EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53, *Blood*, 107(5), pp. 2070-2078.
- Leblanc, V., Delaunay, V., Claude Lelong, J., Gas, F., Mathis, G., Grassi, J., May, E., Yonish-Rouach, E., Deguin, V., Zaitchouk, T., Breugnot, C., Mishal, Z. & Jenkins, J.R. (2002) Homogeneous time-resolved fluorescence assay for identifying p53 interactions with its protein partners, directly in a cellular extract
- Lee, J., Hur, J., Lee, P., Kim, J.Y., Cho, N., Kim, S.Y., Kim, H., Lee, M.S. & Suk, K. (2001) Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells. Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11, *J Biol Chem.*, 276(35), pp. 32956-32965. Epub 32001 Jun 32911.

- Lee, J.H. & Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex, *Science.*, 308(5721), pp. 551-554. Epub 2005 Mar 2024.
- Lee, J.H. & Paull, T.T. (2007) Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks, *Oncogene.*, 26(56), pp. 7741-7748.
- Lee, K.J., Jovanovic, M., Udayakumar, D., Bladen, C.L. & Dynan, W.S. (2004) Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutations at these sites on DNA end joining in a cell-free system, *DNA Repair (Amst)*. 3(3), pp. 267-276.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. & Griffith, J. (1995) p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches, *Cell.*, 81(7), pp. 1013-1020.
- Lee, S.E., Mitchell, R.A., Cheng, A. & Hendrickson, E.A. (1997) Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle, *Mol Cell Biol.*, 17(3), pp. 1425-1433.
- Lee, S.J., Zhou, T., Choi, C., Wang, Z. & Benveniste, E.N. (2000) Differential regulation and function of Fas expression on glial cells, *J Immunol.*, 164(3), pp. 1277-1285.
- Legube, G., Linares, L.K., Lemercier, C., Scheffner, M., Khochbin, S. & Trouche, D. (2002) Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation, *Embo J*, 21(7), pp. 1704-1712.
- Leithauser, F., Dhein, J., Mechttersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Moller, P. (1993) Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells, *Lab Invest*, 69(4), pp. 415-429.
- Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R. & Benchimol, S. (2003) Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation, *Cell.*, 112(6), pp. 779-791.
- Lens, S.M., Tesselaar, K., den Drijver, B.F., van Oers, M.H. & van Lier, R.A. (1996) A dual role for both CD40-ligand and TNF-alpha in controlling human B cell death, *J Immunol*, 156(2), pp. 507-514.
- Leonard, W.J. & O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications, *Annu Rev Immunol.*, 16, pp. 293-322.
- Levav-Cohen, Y., Goldberg, Z., Zuckerman, V., Grossman, T., Haupt, S. & Haupt, Y. (2005) C-Abl as a modulator of p53, *Biochem Biophys Res Commun*, 331(3), pp. 737-749.
- Levine, A.J. (1989) The p53 tumor suppressor gene and gene product, *Princess Takamatsu Symp.*, 20, pp. 221-230.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88(3), pp. 323-331.
- Li, L., Hamilton, R.F., Jr. & Holian, A. (1999) Effect of acrolein on human alveolar macrophage NF-kappaB activity, *Am J Physiol.*, 277(3 Pt 1), pp. L550-557.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. & Gu, W. (2003) Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2, *Science*, 302(5652), pp. 1972-1975.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C.L. & Gu, W. (2002) Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2, *J Biol Chem.*, 277(52), pp. 50607-50611. Epub 2002 Nov 50605.
- Liang, S.H. & Clarke, M.F. (1999) The nuclear import of p53 is determined by the presence of a basic domain and its relative position to the nuclear localization signal, *Oncogene.*, 18(12), pp. 2163-2166.
- Liang, S.H., Hong, D. & Clarke, M.F. (1998) Cooperation of a single lysine mutation and a C-terminal domain in the cytoplasmic sequestration of the p53 protein, *J Biol Chem.*, 273(31), pp. 19817-19821.

- Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. & Livingston, D.M. (1997) Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators, *Nature.*, 387(6635), pp. 823-827.
- Lillemeier, B.F., Koster, M. & Kerr, I.M. (2001) STAT1 from the cell membrane to the DNA, *Embo J.*, 20(10), pp. 2508-2517.
- Lim, D.S., Kirsch, D.G., Canman, C.E., Ahn, J.H., Ziv, Y., Newman, L.S., Darnell, R.B., Shiloh, Y. & Kastan, M.B. (1998) ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(17), pp. 10146-10151.
- Lin, A.W. & Lowe, S.W. (2001) Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(9), pp. 5025-5030. Epub 2001 Apr 5017.
- Lin, J., Johannsen, E., Robertson, E. & Kieff, E. (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2, *J Virol*, 76(1), pp. 232-242.
- Lin, J.Y., Ohshima, T. & Shimotohno, K. (2004) Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53, *FEBS Lett.*, 573(1-3), pp. 15-18.
- Lin, X., Cunningham, E.T., Jr., Mu, Y., Gelezianas, R. & Greene, W.C. (1999) The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases, *Immunity*, 10(2), pp. 271-280.
- Lin, Y., Ma, W. & Benchimol, S. (2000) Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis, *Nat Genet.*, 26(1), pp. 122-127.
- Linzer, D.I. & Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, *Cell.*, 17(1), pp. 43-52.
- Liston, P., Fong, W.G. & Korneluk, R.G. (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2, *Oncogene*, 22(53), pp. 8568-8580.
- Liu, F.T., Newland, A.C. & Jia, L. (2003) Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia, *Biochem Biophys Res Commun.*, 310(3), pp. 956-962.
- Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A. & Hennighausen, L. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis, *Genes Dev.*, 11(2), pp. 179-186.
- Liu, Z., Hergenahn, M., Schmeiser, H.H., Wogan, G.N., Hong, A. & Hollstein, M. (2004) Human tumor p53 mutations are selected for in mouse embryonic fibroblasts harboring a humanized p53 gene, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(9), pp. 2963-2968. Epub 2004 Feb 2919.
- Liu, Z.G., Baskaran, R., Lea-Chou, E.T., Wood, L.D., Chen, Y., Karin, M. & Wang, J.Y. (1996) Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress, *Nature.*, 384(6606), pp. 273-276.
- Liu, Z.J., Lu, X. & Zhong, S. (2005) ASPP--Apoptotic specific regulator of p53, *Biochim Biophys Acta.*, 1756(1), pp. 77-80.
- Lohoff, M. & Mak, T.W. (2005) Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation, *Nat Rev Immunol.*, 5(2), pp. 125-135.
- Lohrum, M.A., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H. & Vousden, K.H. (2000) Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14(ARF) to p53 stabilization, *Curr Biol.*, 10(9), pp. 539-542.
- Longthorne, V.L. & Williams, G.T. (1997) Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis, *Embo J*, 16(13), pp. 3805-3812.

- Lowe, S.W. & Ruley, H.E. (1993) Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis, *Genes Dev.*, 7(4), pp. 535-545.
- Lowe, S.W. (1999) Activation of p53 by oncogenes, *Endocr Relat Cancer.*, 6(1), pp. 45-48.
- Lowe, S.W., Cepero, E. & Evan, G. (2004) Intrinsic tumour suppression, *Nature.*, 432(7015), pp. 307-315.
- Lowe, S.W., Jacks, T., Housman, D.E. & Ruley, H.E. (1994) Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91(6), pp. 2026-2030.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. & Housman, D.E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell.*, 74(6), pp. 957-967.
- Lu, H. & Levine, A.J. (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(11), pp. 5154-5158.
- Lu, T. & Stark, G.R. (2004) Cytokine overexpression and constitutive NFkappaB in cancer, *Cell Cycle.*, 3(9), pp. 1114-1117. Epub 2004 Sep 1114.
- Lu, X. & Lane, D.P. (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell.*, 75(4), pp. 765-778.
- Ludwig, R.L., Bates, S. & Vousden, K.H. (1996) Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function, *Mol Cell Biol.*, 16(9), pp. 4952-4960.
- Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M.S., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B. & Kieff, E. (2004) Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(1), pp. 141-146.
- Luo, J., Li, M., Tang, Y., Laszkowska, M., Roeder, R.G. & Gu, W. (2004) Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(8), pp. 2259-2264.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. & Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage, *Science.*, 288(5470), pp. 1425-1429.
- Malakhov, M.P., Kim, K.I., Malakhova, O.A., Jacobs, B.S., Borden, E.C. & Zhang, D.E. (2003) High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction, *J Biol Chem.*, 278(19), pp. 16608-16613. Epub 12003 Feb 16611.
- Malakhova, O.A., Yan, M., Malakhov, M.P., Yuan, Y., Ritchie, K.J., Kim, K.I., Peterson, L.F., Shuai, K. & Zhang, D.E. (2003) Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway, *Genes Dev.*, 17(4), pp. 455-460.
- Mallya, S.M. & Sikpi, M.O. (1998) Evidence of the involvement of p53 in gamma-radiation-induced DNA repair in human lymphoblasts, *Int J Radiat Biol.*, 74(2), pp. 231-238.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M.J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R. & Hiscott, J. (1999) Interferon regulatory factors: the next generation, *Gene.*, 237(1), pp. 1-14.
- Mao, X., Ren, Z., Parker, G.N., Sondermann, H., Pastorello, M.A., Wang, W., McMurray, J.S., Demeler, B., Darnell, J.E., Jr. & Chen, X. (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding, *Mol Cell.*, 17(6), pp. 761-771.
- Marahatta, S.B., Sharma, N., Koju, R., Makaju, R.K., Petmitr, P. & Petmitr, S. (2005) Cancer: determinants and progression, *Nepal Med Coll J.*, 7(1), pp. 65-71.

- Marchenko, N.D., Zaika, A. & Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling, *J Biol Chem.*, 275(21), pp. 16202-16212.
- Marchetti, P., Hirsch, T., Zamzami, N., Castedo, M., Decaudin, D., Susin, S.A., Mase, B. & Kroemer, G. (1996) Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis, *J Immunol*, 157(11), pp. 4830-4836.
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M. & Vinkemeier, U. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1, *J Cell Biol.*, 165(6), pp. 823-833.
- Marine, J.C. & Jochemsen, A.G. (2005) Mdmx as an essential regulator of p53 activity, *Biochem Biophys Res Commun.*, 331(3), pp. 750-760.
- Martinon, F. & Tschopp, J. (2004) Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases, *Cell.*, 117(5), pp. 561-574.
- Matsuda, K., Yoshida, K., Taya, Y., Nakamura, K., Nakamura, Y. & Arakawa, H. (2002) p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway, *Cancer Res.*, 62(10), pp. 2883-2889.
- Matsuyama, T., Kimura, T., Kitagawa, M., Pfeffer, K., Kawakami, T., Watanabe, N., Kundig, T.M., Amakawa, R., Kishihara, K., Wakeham, A. & et al. (1993) Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development, *Cell.*, 75(1), pp. 83-97.
- Mattson, M.P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature*, 430(7000), pp. 631-639.
- May, P. & May, E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, *Oncogene.*, 18(53), pp. 7621-7636.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M.B., Katzir, E. & Oren, M. (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage, *Genes Dev.*, 15(9), pp. 1067-1077.
- Mayo, L.D., Seo, Y.R., Jackson, M.W., Smith, M.L., Rivera Guzman, J., Korgaonkar, C.K. & Donner, D.B. (2005) Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified, *J Biol Chem.*, 280(28), pp. 25953-25959. Epub 22005 Apr 25920.
- McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C. & Reich, N.C. (2002) Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha, *Embo J.*, 21(7), pp. 1754-1763.
- McBride, O.W., Merry, D. & Givol, D. (1986) The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13), *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 83(1), pp. 130-134.
- McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S. & Evan, G.I. (1997) Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak, *J Cell Biol.*, 136(1), pp. 215-227.
- McDermott, U., Longley, D.B., Galligan, L., Allen, W., Wilson, T. & Johnston, P.G. (2005) Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, Fas-mediated apoptosis in colorectal cancer, *Cancer Res*, 65(19), pp. 8951-8960.
- McKinney, K. & Prives, C. (2002) Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein, *Mol Cell Biol.*, 22(19), pp. 6797-6808.
- McKinney, K., Mattia, M., Gottifredi, V. & Prives, C. (2004) p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus, *Mol Cell.*, 16(3), pp. 413-424.

- McShane, M.P., Mullen, M.M., Haan, K.M., Jardetzky, T.S. & Longnecker, R. (2003) Mutational analysis of the HLA class II interaction with Epstein-Barr virus glycoprotein 42, *J Virol*, 77(13), pp. 7655-7662.
- McWhirter, J.R. & Wang, J.Y. (1991) Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins, *Mol Cell Biol.*, 11(3), pp. 1553-1565.
- McWhirter, J.R., Galasso, D.L. & Wang, J.Y. (1993) A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins, *Mol Cell Biol.*, 13(12), pp. 7587-7595.
- Melchior, F. & Hengst, L. (2002) SUMO-1 and p53, *Cell Cycle.*, 1(4), pp. 245-249.
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W.X., Corazzari, M., Knight, R.A., Green, D.R., Thompson, C. & Vousden, K.H. (2004) p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation, *J Biol Chem.*, 279(9), pp. 8076-8083. Epub 2003 Nov 8021.
- Melino, G., De Laurenzi, V. & Vousden, K.H. (2002) p73: Friend or foe in tumorigenesis, *Nat Rev Cancer.*, 2(8), pp. 605-615.
- Meng, R.D., McDonald, E.R., 3rd, Sheikh, M.S., Fornace, A.J., Jr. & El-Deiry, W.S. (2000) The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis, *Mol Ther.*, 1(2), pp. 130-144.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R.N., Clark, R., Aguet, M. & Schreiber, R.D. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway, *Cell.*, 84(3), pp. 431-442.
- Mi, J., Li, Z.Y., Ni, S., Steinwaerder, D. & Lieber, A. (2001) Induced apoptosis supports spread of adenovirus vectors in tumors, *Hum Gene Ther.*, 12(10), pp. 1343-1352.
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. & Dimanche-Boitrel, M.T. (1999) Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs, *J Biol Chem*, 274(12), pp. 7987-7992.
- Middeldorp, J.M., Brink, A.A., van den Brule, A.J. & Meijer, C.J. (2003) Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders, *Crit Rev Oncol Hematol*, 45(1), pp. 1-36.
- Migliorini, D., Lazzerini Denchi, E., Danovi, D., Jochemsen, A., Capillo, M., Gobbi, A., Helin, K., Pelicci, P.G. & Marine, J.C. (2002) Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development, *Mol Cell Biol.*, 22(15), pp. 5527-5538.
- Migone, T.S., Lin, J.X., Cereseto, A., Mulloy, J.C., O'Shea, J.J., Franchini, G. & Leonard, W.J. (1995) Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I, *Science.*, 269(5220), pp. 79-81.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. & Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria, *Mol Cell.*, 11(3), pp. 577-590.
- Mikolajczyk, J., Scott, F.L., Krajewski, S., Sutherlin, D.P. & Salvesen, G.S. (2004) Activation and substrate specificity of caspase-14, *Biochemistry*, 43(32), pp. 10560-10569.
- Miller, G. (1974) The oncogenicity of Epstein-Barr virus, *J Infect Dis*, 130(2), pp. 187-205.
- Miller, N. & Hutt-Fletcher, L.M. (1988) A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus, *J Virol*, 62(7), pp. 2366-2372.
- Miller, S.J., Suthiphongchai, T., Zambetti, G.P. & Ewen, M.E. (2000) p53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for

- transforming growth factor beta- and p53-mediated translational inhibition of cdk4, *Mol Cell Biol.*, 20(22), pp. 8420-8431.
- Milner, J. & Medcalf, E.A. (1991) Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation, *Cell.*, 65(5), pp. 765-774.
- Miossec, C., Dutilleul, V., Fassy, F. & Diu-Hercend, A. (1997) Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation, *J Biol Chem*, 272(21), pp. 13459-13462.
- Mitchell, T. & Sugden, B. (1995) Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus, *J Virol*, 69(5), pp. 2968-2976.
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T. & Taniguchi, T. (1988) Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements, *Cell.*, 54(6), pp. 903-913.
- Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene, *Cell*, 80(2), pp. 293-299.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. & Reed, J.C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene.*, 9(6), pp. 1799-1805.
- Molesworth, S.J., Lake, C.M., Borza, C.M., Turk, S.M. & Hutt-Fletcher, L.M. (2000) Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells, *J Virol*, 74(14), pp. 6324-6332.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. & Levine, A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation, *Cell.*, 69(7), pp. 1237-1245.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 13, pp. 261-291.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 13, pp. 261-291.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H. & Helin, K. (2001) Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53, *Nat Cell Biol.*, 3(6), pp. 552-558.
- Mosialos, G. (2001) Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation, *Cytokine Growth Factor Rev*, 12(2-3), pp. 259-270.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. & Kieff, E. (1995) The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family, *Cell*, 80(3), pp. 389-399.
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F. & Deppert, W. (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis, *Embo J.*, 14(18), pp. 4442-4449.
- Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R. & David, M. (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription, *Cell.*, 104(5), pp. 731-741.
- Moynagh, P.N. (2005) The NF-kappaB pathway, *J Cell Sci*, 118(Pt 20), pp. 4589-4592.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M. & Krammer, P.H. (1998a) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs, *J Exp Med*, 188(11), pp. 2033-2045.
- Muller, S., Ledl, A. & Schmidt, D. (2004) SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity, *Oncogene.*, 23(11), pp. 1998-2008.

- Munarriz, E., Barcaroli, D., Stephanou, A., Townsend, P.A., Maise, C., Terrinoni, A., Neale, M.H., Martin, S.J., Latchman, D.S., Knight, R.A., Melino, G. & De Laurenzi, V. (2004) PIAS-1 is a checkpoint regulator which affects exit from G1 and G2 by sumoylation of p73, *Mol Cell Biol.*, 24(24), pp. 10593-10610.
- Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J.C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. & Reisdorf, P. (2000) Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis, *J Biol Chem.*, 275(6), pp. 3867-3872.
- Murphy, M., Hinman, A. & Levine, A.J. (1996) Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein, *Genes Dev.*, 10(23), pp. 2971-2980.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation, *J Biol Chem*, 273(5), pp. 2926-2930.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995) The Fas death factor, *Science.*, 267(5203), pp. 1449-1456.
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor, *Cell*, 88(3), pp. 355-365.
- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G.W., Raphael, M., Feuillard, J. & Fagard, R. (2005) Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells, *J Virol*, 79(8), pp. 4936-4943.
- Nakamura, Y. (2004) Isolation of p53-target genes and their functional analysis, *Cancer Sci.*, 95(1), pp. 7-11.
- Nakano, K. & Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol Cell.*, 7(3), pp. 683-694.
- Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Nakayama, M., Kawa, K. & Yoshie, O. (2004) Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus, *J Virol*, 78(4), pp. 1665-1674.
- Nayak, B.K. & Das, B.R. (1997) Differential binding of nuclear proteins to the TP53 gene promoter in male breast tumour, *Eur J Cancer.*, 33(9), pp. 1484-1487.
- Neculai, D., Neculai, A.M., Verrier, S., Straub, K., Klumpp, K., Pfitzner, E. & Becker, S. (2005) Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer, *J Biol Chem.*, 280(49), pp. 40782-40787. Epub 42005 Sep 40728.
- Nie, Y., Li, H.H., Bula, C.M. & Liu, X. (2000) Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization, *Mol Cell Biol.*, 20(3), pp. 741-748.
- Nieborowska-Skorska, M., Wasik, M.A., Slupianek, A., Salomoni, P., Kitamura, T., Calabretta, B. & Skorski, T. (1999) Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis, *J Exp Med.*, 189(8), pp. 1229-1242.
- Nikolaev, A.Y., Li, M., Puskas, N., Qin, J. & Gu, W. (2003) Parc: a cytoplasmic anchor for p53, *Cell.*, 112(1), pp. 29-40.
- Nilsson, K. (1992) Human B-lymphoid cell lines, *Hum Cell*, 5(1), pp. 25-41.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. & Smith, J.R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen, *Exp Cell Res.*, 211(1), pp. 90-98.
- Noh, S.J., Li, Y., Xiong, Y. & Guan, K.L. (1999) Identification of functional elements of p18INK4C essential for binding and inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 4 and CDK6, *Cancer Res.*, 59(3), pp. 558-564.

- Nusinzon, I. & Horvath, C.M. (2003) Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(25), pp. 14742-14747. Epub 12003 Nov 14725.
- Obaya, A.J. & Sedivy, J.M. (2002) Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells, *Cell Mol Life Sci.*, 59(1), pp. 126-142.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. & Taya, Y. (2000) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53, *Cell.*, 102(6), pp. 849-862.
- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B.C. & et al. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen, *J Biol Chem*, 267(15), pp. 10709-10715.
- Ogasawara, S., Tamura, G., Maesawa, C., Suzuki, Y., Ishida, K., Satoh, N., Uesugi, N., Saito, K. & Satodate, R. (1996) Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma, *Gastroenterology.*, 110(1), pp. 52-57.
- Ohmori, Y. & Hamilton, T.A. (2000) Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms, *J Biol Chem.*, 275(48), pp. 38095-38103.
- Ohmori, Y. & Hamilton, T.A. (2001) Requirement for STAT1 in LPS-induced gene expression in macrophages, *J Leukoc Biol.*, 69(4), pp. 598-604.
- Ohmori, Y., Schreiber, R.D. & Hamilton, T.A. (1997) Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB, *J Biol Chem.*, 272(23), pp. 14899-14907.
- Okamoto, K. & Beach, D. (1994) Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein, *Embo J.*, 13(20), pp. 4816-4822.
- Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C.C., Taya, Y., Monden, M. & Nakamura, Y. (2001) p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis, *Mol Cell.*, 8(1), pp. 85-94.
- O'Keefe, K., Li, H. & Zhang, Y. (2003) Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination, *Mol Cell Biol.*, 23(18), pp. 6396-6405.
- Okudaira, T., Yamamoto, K., Kawakami, H., Uchihara, J.N., Tomita, M., Masuda, M., Matsuda, T., Sairenji, T., Iha, H., Jeang, K.T., Matsuyama, T., Takasu, N. & Mori, N. (2006) Transactivation of CCL20 gene by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1, *Br J Haematol*, 132(3), pp. 293-302.
- Oliner, J.D. (1993) Discerning the function of p53 by examining its molecular interactions, *Bioessays.*, 15(11), pp. 703-707.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L. & Vogelstein, B. (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas, *Nature.*, 358(6381), pp. 80-83.
- O'Shea, J.J., Gadina, M. & Schreiber, R.D. (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway, *Cell.*, 109(Suppl), pp. S121-131.
- Ossina, N.K., Cannas, A., Powers, V.C., Fitzpatrick, P.A., Knight, J.D., Gilbert, J.R., Shekhtman, E.M., Tomei, L.D., Umansky, S.R. & Kiefer, M.C. (1997) Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression, *J Biol Chem.*, 272(26), pp. 16351-16357.

- Ouchi, T., Lee, S.W., Ouchi, M., Aaronson, S.A. & Horvath, C.M. (2000) Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(10), pp. 5208-5213.
- Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene.*, 18(49), pp. 6853-6866.
- Paine, E., Scheinman, R.I., Baldwin, A.S., Jr. & Raab-Traub, N. (1995) Expression of LMP1 in epithelial cells leads to the activation of a select subset of NF-kappa B/Rel family proteins, *J Virol*, 69(7), pp. 4572-4576.
- Palmero, I., Pantoja, C. & Serrano, M. (1998) p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras, *Nature.*, 395(6698), pp. 125-126.
- Pamment, J., Ramsay, E., Kelleher, M., Dornan, D. & Ball, K.L. (2002) Regulation of the IRF-1 tumour modifier during the response to genotoxic stress involves an ATM-dependent signalling pathway, *Oncogene*, 21(51), pp. 7776-7785.
- Pan, Y. & Chen, J. (2003) MDM2 promotes ubiquitination and degradation of MDMX, *Mol Cell Biol.*, 23(15), pp. 5113-5121.
- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A. & Ruberti, G. (1999) Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor, *J Biol Chem*, 274(53), pp. 38241-38250.
- Parisien, J.P., Lau, J.F. & Horvath, C.M. (2002a) STAT2 acts as a host range determinant for species-specific paramyxovirus interferon antagonism and simian virus 5 replication, *J Virol.*, 76(13), pp. 6435-6441.
- Parisien, J.P., Lau, J.F., Rodriguez, J.J., Ulane, C.M. & Horvath, C.M. (2002b) Selective STAT protein degradation induced by paramyxoviruses requires both STAT1 and STAT2 but is independent of alpha/beta interferon signal transduction, *J Virol.*, 76(9), pp. 4190-4198.
- Park, J.H. & Faller, D.V. (2002) Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 induction by histone deacetylase inhibitors mediates induction of intercellular adhesion molecule-1 expression and homotypic aggregation, *Virology*, 303(2), pp. 345-363.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P. & Pelicci, P.G. (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras, *Nature.*, 406(6792), pp. 207-210.
- Pegtel, D.M., Middeldorp, J. & Thorley-Lawson, D.A. (2004) Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers, *J Virol*, 78(22), pp. 12613-12624.
- Pendergast, A.M. (2005) Stress and death: breaking up the c-Abl/14-3-3 complex in apoptosis, *Nat Cell Biol.*, 7(3), pp. 213-214.
- Peng, M. & Lundgren, E. (1992) Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis, *Oncogene.*, 7(9), pp. 1775-1782.
- Peng, R., Moses, S.C., Tan, J., Kremmer, E. & Ling, P.D. (2005) The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter, *J Virol*, 79(7), pp. 4492-4505.
- Pervaiz, S. (2004) Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol, *Drug Resist Updat*, 7(6), pp. 333-344.
- Peterson, C.L. & Cote, J. (2004) Cellular machineries for chromosomal DNA repair, *Genes Dev.*, 18(6), pp. 602-616.

- Pierce, J.H., Di Fiore, P.P., Aaronson, S.A., Potter, M., Pumphrey, J., Scott, A. & Ihle, J.N. (1985) Neoplastic transformation of mast cells by Abelson-MuLV: abrogation of IL-3 dependence by a nonautocrine mechanism, *Cell.*, 41(3), pp. 685-693.
- Pines, J. (1993) Cyclins and their associated cyclin-dependent kinases in the human cell cycle, *Biochem Soc Trans*, 21(4), pp. 921-925.
- Pines, J. (1994) Protein kinases and cell cycle control, *Semin Cell Biol.*, 5(6), pp. 399-408.
- Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K.A., Kazlauskas, A. & Pendergast, A.M. (1999) c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF, *Genes Dev.*, 13(18), pp. 2400-2411.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. & Koff, A. (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest, *Genes Dev*, 8(1), pp. 9-22.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis, *Nature.*, 389(6648), pp. 300-305.
- Pomerantz, B.J., Reznikov, L.L., Harken, A.H. & Dinarello, C.A. (2001) Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(5), pp. 2871-2876.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C. & DePinho, R.A. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53, *Cell.*, 92(6), pp. 713-723.
- Pope, J.H., Horne, M.K. & Scott, W. (1968) Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus, *Int J Cancer*, 3(6), pp. 857-866.
- Porta, C., Hadj-Slimane, R., Nejmeddine, M., Pampin, M., Tovey, M.G., Espert, L., Alvarez, S. & Chelbi-Alix, M.K. (2005) Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively, *Oncogene*, 24(4), pp. 605-615.
- Pouget, J.P., Frelon, S., Ravanat, J.L., Testard, I., Odin, F. & Cadet, J. (2002) Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles, *Radiat Res.*, 157(5), pp. 589-595.
- Prives, C. & Manley, J.L. (2001) Why is p53 acetylated? *Cell.*, 107(7), pp. 815-818.
- Quelle, F.W., Thierfelder, W., Witthuhn, B.A., Tang, B., Cohen, S. & Ihle, J.N. (1995) Phosphorylation and activation of the DNA binding activity of purified Stat1 by the Janus protein-tyrosine kinases and the epidermal growth factor receptor, *J Biol Chem.*, 270(35), pp. 20775-20780.
- Raina, D., Pandey, P., Ahmad, R., Bharti, A., Ren, J., Kharbanda, S., Weichselbaum, R. & Kufe, D. (2005) c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage, *J Biol Chem.*, 280(12), pp. 11147-11151. Epub 12005 Jan 11118.
- Rathmell, W.K., Kaufmann, W.K., Hurt, J.C., Byrd, L.L. & Chu, G. (1997) DNA-dependent protein kinase is not required for accumulation of p53 or cell cycle arrest after DNA damage, *Cancer Res.*, 57(1), pp. 68-74.
- Ravagnan, L., Roumier, T. & Kroemer, G. (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons, *J Cell Physiol.*, 192(2), pp. 131-137.
- Ravi, R., Bedi, A., Fuchs, E.J. & Bedi, A. (1998) CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB, *Cancer Res*, 58(5), pp. 882-886.
- Rawlings, J.S., Rosler, K.M. & Harrison, D.A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway, *J Cell Sci.*, 117(Pt 8), pp. 1281-1283.
- Reed, J.C. (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer, *J Clin Oncol*, 17(9), pp. 2941-2953.

- Refaeli, Y., Van Parijs, L., Alexander, S.I. & Abbas, A.K. (2002) Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes, *J Exp Med.*, 196(7), pp. 999-1005.
- Reich, N.C. & Liu, L. (2006) Tracking STAT nuclear traffic, *Nat Rev Immunol.*, 6(8), pp. 602-612.
- Reisman, D., Greenberg, M. & Rotter, V. (1988) Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85(14), pp. 5146-5150.
- Rhee, S.H., Jones, B.W., Toshchakov, V., Vogel, S.N. & Fenton, M.J. (2003) Toll-like receptors 2 and 4 activate STAT1 serine phosphorylation by distinct mechanisms in macrophages, *J Biol Chem.*, 278(25), pp. 22506-22512. Epub 22003 Apr 22509.
- Richardson, C., Fielding, C., Rowe, M. & Brennan, P. (2003) Epstein-Barr virus regulates STAT1 through latent membrane protein 1, *J Virol*, 77(7), pp. 4439-4443.
- Riedl, S.J., Renatus, M., Snipas, S.J. & Salvesen, G.S. (2001) Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35, *Biochemistry*, 40(44), pp. 13274-13280.
- Ristic, D., Modesti, M., Kanaar, R. & Wyman, C. (2003) Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair, *Nucleic Acids Res.*, 31(18), pp. 5229-5237.
- Robles, A.I., Bemmels, N.A., Foraker, A.B. & Harris, C.C. (2001) APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis, *Cancer Res.*, 61(18), pp. 6660-6664.
- Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme, *Genes Dev*, 13(24), pp. 3179-3184.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P. & Hay, R.T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53, *Embo J.*, 18(22), pp. 6455-6461.
- Rogers, R.S., Horvath, C.M. & Matunis, M.J. (2003) SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation, *J Biol Chem.*, 278(32), pp. 30091-30097. Epub 32003 May 30022.
- Ronen, D., Rotter, V. & Reisman, D. (1991) Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88(10), pp. 4128-4132.
- Roshal, M., Zhu, Y. & Planelles, V. (2001) Apoptosis in AIDS, *Apoptosis*, 6(1-2), pp. 103-116.
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T. & Levine, A.J. (1998) Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein, *Embo J.*, 17(2), pp. 554-564.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D.S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E. & Rickinson, A.B. (1994) Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers, *J Virol*, 68(9), pp. 5602-5612.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. & Pavletich, N.P. (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex, *Nature*, 382(6589), pp. 325-331.
- Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R. & Vousden, K.H. (2000) Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death, *Nature.*, 404(6780), pp. 892-897.
- Sabbatini, P. & McCormick, F. (2002) MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53, *DNA Cell Biol.*, 21(7), pp. 519-525.

- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. & Grosschedl, R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies, *Genes Dev.*, 15(23), pp. 3088-3103.
- Sadler, R.H. & Raab-Traub, N. (1995) The Epstein-Barr virus 3.5-kilobase latent membrane protein 1 mRNA initiates from a TATA-Less promoter within the first terminal repeat, *J Virol*, 69(7), pp. 4577-4581.
- Saharinen, P., Takaluoma, K. & Silvennoinen, O. (2000) Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain, *Mol Cell Biol.*, 20(10), pp. 3387-3395.
- Saito, N., Courtois, G., Chiba, A., Yamamoto, N., Nitta, T., Hironaka, N., Rowe, M., Yamamoto, N. & Yamaoka, S. (2003) Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines, *J Biol Chem*, 278(47), pp. 46565-46575.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. & Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade, *Genes Dev.*, 12(18), pp. 2831-2841.
- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T. & Lu, X. (2001) ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53, *Mol Cell.*, 8(4), pp. 781-794.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. & Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, *Annu Rev Biochem.*, 73, pp. 39-85.
- Sandberg, M.L., Kaykas, A. & Sugden, B. (2000) Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus inhibits as well as stimulates gene expression, *J Virol*, 74(20), pp. 9755-9761.
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N.D. & Moll, U.M. (2001) Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells, *FEBS Lett.*, 488(3), pp. 110-115.
- Sathasivam, S., Ince, P.G. & Shaw, P.J. (2001) Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27(4), pp. 257-274.
- Sato, T., Hirasawa, A., Kawabuchi, Y., Nishikawa, T. & Wakabayashi, Y. (2000) Cellular expressions and serum concentrations of Fas ligand and Fas receptor in patients with infectious mononucleosis, *Int J Hematol*, 72(3), pp. 329-336.
- Savage, K.J., Monti, S., Kutok, J.L., Cattoretti, G., Neuberg, D., De Leval, L., Kurtin, P., Dal Cin, P., Ladd, C., Feuerhake, F., Aguiar, R.C., Li, S., Salles, G., Berger, F., Jing, W., Pinkus, G.S., Habermann, T., Dalla-Favera, R., Harris, N.L., Aster, J.C., Golub, T.R. & Shipp, M.A. (2003) The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma, *Blood*, 102(12), pp. 3871-3879.
- Savard, M., Belanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L. & Gosselin, J. (2000) Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus, *J Virol*, 74(6), pp. 2612-2619.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.G., Taylor, A.M., Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S. & Shiloh, Y. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science.*, 268(5218), pp. 1749-1753.
- Savitsky, K., Platzer, M., Uziel, T., Gilad, S., Sartiel, A., Rosenthal, A., Elroy-Stein, O., Shiloh, Y. & Rotman, G. (1997) Ataxia-telangiectasia: structural diversity of untranslated sequences suggests complex post-transcriptional regulation of ATM gene expression, *Nucleic Acids Res.*, 25(9), pp. 1678-1684.

- Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J. & El-Deiry, W.S. (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity, *Nat Cell Biol.*, 4(11), pp. 842-849.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. & Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell.*, 63(6), pp. 1129-1136.
- Schindler, C.W. (2002) Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease, *J Clin Invest.*, 109(9), pp. 1133-1137.
- Schuler, M., Bossy-Wetzel, E., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P. & Green, D.R. (2000) p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release, *J Biol Chem.*, 275(10), pp. 7337-7342.
- Schuster, V.H. & Muschen, M. (2003) Epstein-Barr virus and the B cell: a secret romance, *Trends Microbiol.*, 11(6), pp. 243-245.
- Schutte, B., Henfling, M., Kolgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M.P., Nap, M., Bjorklund, V., Bjorklund, P., Bjorklund, B., Lane, E.B., Omary, M.B., Jornvall, H. & Ramaekers, F.C. (2004) Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis, *Exp Cell Res.*, 297(1), pp. 11-26.
- Schwikowski, B., Uetz, P. & Fields, S. (2000) A network of protein-protein interactions in yeast, *Nat Biotechnol.*, 18(12), pp. 1257-1261.
- Sengupta, S. & Harris, C.C. (2005) p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6(1), pp. 44-55.
- Senoo, M., Manis, J.P., Alt, F.W. & McKeon, F. (2004) p63 and p73 are not required for the development and p53-dependent apoptosis of T cells, *Cancer Cell.*, 6(1), pp. 85-89.
- Seo, Y.W., Shin, J.N., Ko, K.H., Cha, J.H., Park, J.Y., Lee, B.R., Yun, C.W., Kim, Y.M., Seol, D.W., Kim, D.W., Yin, X.M. & Kim, T.H. (2003) The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death, *J Biol Chem.*, 278(48), pp. 48292-48299. Epub 42003 Sep 48218.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, *Cell.*, 88(5), pp. 593-602.
- Shafman, T., Khanna, K.K., Kedar, P., Spring, K., Kozlov, S., Yen, T., Hobson, K., Gatei, M., Zhang, N., Watters, D., Egerton, M., Shiloh, Y., Kharbanda, S., Kufe, D. & Lavin, M.F. (1997) Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage, *Nature*, 387(6632), pp. 520-523.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity, *Nature.*, 410(6832), pp. 1107-1111.
- Shannon-Lowe, C.D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A.B. & Delecluse, H.J. (2006) Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(18), pp. 7065-7070.
- Shao, J.Y., Emberg, I., Biberfeld, P., Heiden, T., Zeng, Y.X. & Hu, L.F. (2004) Epstein-Barr virus LMP1 status in relation to apoptosis, p53 expression and leucocyte infiltration in nasopharyngeal carcinoma, *Anticancer Res.*, 24(4), pp. 2309-2318.
- Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J. & George, D.L. (1999) Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein, *J Biol Chem.*, 274(53), pp. 38189-38196.
- Sharpless, N.E. & DePinho, R.A. (1999) The INK4A/ARF locus and its two gene products, *Curr Opin Genet Dev.*, 9(1), pp. 22-30.
- Sharpless, N.E. & DePinho, R.A. (2007) How stem cells age and why this makes us grow old, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(9), pp. 703-713.

- Sherr, C.J. & Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev.*, 13(12), pp. 1501-1512.
- Sherr, C.J. (1994) The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock, *Trends Cell Biol.*, 4(1), pp. 15-18.
- Shi, Y., Alin, K. & Goff, S.P. (1995) Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity, *Genes Dev.*, 9(21), pp. 2583-2597.
- Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response, *Genes Dev.*, 17(18), pp. 2233-2238. Epub 2003 Sep 2232.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites, *Genes Dev.*, 14(3), pp. 289-300.
- Shikama, N., Lee, C.W., France, S., Delavaine, L., Lyon, J., Krstic-Demonacos, M. & La Thangue, N.B. (1999) A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response, *Mol Cell.*, 4(3), pp. 365-376.
- Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity, *Nat Rev Cancer*, 3(3), pp. 155-168.
- Shimakage, M., Kimura, M., Yanoma, S., Ibe, M., Yokota, S., Tsujino, G., Kozuka, T., Dezawa, T., Tamura, S., Ohshima, A., Yutsudo, M. & Hakura, A. (1999) Expression of latent and replicative-infection genes of Epstein-Barr virus in macrophage, *Arch Virol*, 144(1), pp. 157-166.
- Shirakata, M., Imadome, K.I., Okazaki, K. & Hirai, K. (2001) Activation of TRAF5 and TRAF6 signal cascades negatively regulates the latent replication origin of Epstein-Barr virus through p38 mitogen-activated protein kinase, *J Virol.*, 75(11), pp. 5059-5068.
- Shmueli, A. & Oren, M. (2004) Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers, *Mol Cell.*, 13(1), pp. 4-5.
- Shuai, K. & Liu, B. (2003) Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system, *Nat Rev Immunol.*, 3(11), pp. 900-911.
- Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N. & Young, H.A. (1997) Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter, *J Biol Chem.*, 272(48), pp. 30412-30420.
- Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y. & Lenardo, M.J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations, *Science*, 288(5475), pp. 2354-2357.
- Simon, A.R., Rai, U., Fanburg, B.L. & Cochran, B.H. (1998) Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species, *Am J Physiol.*, 275(6 Pt 1), pp. C1640-1652.
- Simonis, N., van Helden, J., Cohen, G.N. & Wodak, S.J. (2004) Transcriptional regulation of protein complexes in yeast, *Genome Biol.*, 5(5), pp. R33. Epub 2004 Apr 2030.
- Sionov, R.V., Coen, S., Goldberg, Z., Berger, M., Bercovich, B., Ben-Neriah, Y., Ciechanover, A. & Haupt, Y. (2001) c-Abl regulates p53 levels under normal and stress conditions by preventing its nuclear export and ubiquitination, *Mol Cell Biol.*, 21(17), pp. 5869-5878.
- Sionov, R.V., Moallem, E., Berger, M., Kazaz, A., Gerlitz, O., Ben-Neriah, Y., Oren, M. & Haupt, Y. (1999) c-Abl neutralizes the inhibitory effect of Mdm2 on p53, *J Biol Chem*, 274(13), pp. 8371-8374.
- Sironi, J.J. & Ouchi, T. (2004) STAT1-induced apoptosis is mediated by caspases 2, 3, and 7, *J Biol Chem*, 279(6), pp. 4066-4074. Epub 2003 Nov 4017.

- Sjoblom, A., Jansson, A., Yang, W., Lain, S., Nilsson, T. & Rymo, L. (1995) PU box-binding transcription factors and a POU domain protein cooperate in the Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2-induced transactivation of the EBV latent membrane protein 1 promoter, *J Gen Virol*, 76 (Pt 11), pp. 2679-2692.
- Sjoblom, A., Yang, W., Palmqvist, L., Jansson, A. & Rymo, L. (1998) An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter, *J Virol*, 72(2), pp. 1365-1376.
- Slee, E.A. & Lu, X. (2003) The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage, *Toxicol Lett.*, 139(2-3), pp. 81-87.
- Slee, E.A., Gillotin, S., Bergamaschi, D., Royer, C., Llanos, S., Ali, S., Jin, B., Trigianti, G. & Lu, X. (2004) The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization, *Oncogene*, 23(56), pp. 9007-9016.
- Slingerland, J.M., Hengst, L., Pan, C.H., Alexander, D., Stampfer, M.R. & Reed, S.I. (1994) A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells, *Mol Cell Biol*, 14(6), pp. 3683-3694.
- Smith, G.C., Cary, R.B., Lakin, N.D., Hann, B.C., Teo, S.H., Chen, D.J. & Jackson, S.P. (1999) Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(20), pp. 11134-11139.
- Soengas, M.S., Alarcon, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mak, T.W. & Lowe, S.W. (1999) Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition, *Science*, 284(5411), pp. 156-159.
- Soldani, C. & Scovassi, A.I. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update, *Apoptosis*, 7(4), pp. 321-328.
- Speck, P. & Longnecker, R. (2000) Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact, *J Natl Cancer Inst*, 92(22), pp. 1849-1851.
- Sprinzak, E., Sattath, S. & Margalit, H. (2003) How reliable are experimental protein-protein interaction data? *J Mol Biol.*, 327(5), pp. 919-923.
- Spurgers, K.B., Gold, D.L., Coombes, K.R., Bohnenstiehl, N.L., Mullins, B., Meyn, R.E., Logothetis, C.J. & McDonnell, T.J. (2006) Identification of cell cycle regulatory genes as principal targets of p53-mediated transcriptional repression, *J Biol Chem.*, 281(35), pp. 25134-25142. Epub 22006 Jun 25123.
- Stad, R., Little, N.A., Xirodimas, D.P., Frenk, R., van der Eb, A.J., Lane, D.P., Saville, M.K. & Jochemsen, A.G. (2001) Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms, *EMBO Rep.*, 2(11), pp. 1029-1034. Epub 2001 Oct 1017.
- Stancato, L.F., David, M., Carter-Su, C., Larner, A.C. & Pratt, W.B. (1996) Preassociation of STAT1 with STAT2 and STAT3 in separate signalling complexes prior to cytokine stimulation, *J Biol Chem.*, 271(8), pp. 4134-4137.
- Stang, M.T., Armstrong, M.J., Watson, G.A., Sung, K.Y., Liu, Y., Ren, B. & Yim, J.H. (2007) Interferon regulatory factor-1-induced apoptosis mediated by a ligand-independent fas-associated death domain pathway in breast cancer cells, *Oncogene*, 26(44), pp. 6420-6430. Epub 2007 Apr 6423.
- Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E. & McCubrey, J.A. (2004) JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis, *Leukemia*, 18(2), pp. 189-218.
- Stenger, J.E., Mayr, G.A., Mann, K. & Tegtmeier, P. (1992) Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers, *Mol Carcinog.*, 5(2), pp. 102-106.
- Stephanou, A. (2002) Activated STAT-1 pathway in the myocardium as a novel therapeutic target in ischaemia/reperfusion injury, *Eur Cytokine Netw.*, 13(4), pp. 401-403.
- Stephanou, A., Brar, B., Liao, Z., Scarabelli, T., Knight, R.A. & Latchman, D.S. (2001) Distinct initiator caspases are required for the induction of apoptosis in cardiac

- myocytes during ischaemia versus reperfusion injury, *Cell Death Differ.*, 8(4), pp. 434-435.
- Stephanou, A., Brar, B.K., Knight, R.A. & Latchman, D.S. (2000a) Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters, *Cell Death Differ.*, 7(3), pp. 329-330.
- Stephanou, A., Brar, B.K., Scarabelli, T.M., Jonassen, A.K., Yellon, D.M., Marber, M.S., Knight, R.A. & Latchman, D.S. (2000b) Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis, *J Biol Chem.*, 275(14), pp. 10002-10008.
- Stevens, A.M. & Yu-Lee, L.Y. (1992) The transcription factor interferon regulatory factor-1 is expressed during both early G1 and the G1/S transition in the prolactin-induced lymphocyte cell cycle, *Mol Endocrinol.*, 6(12), pp. 2236-2243.
- Stevens, A.M. & Yu-Lee, L.Y. (1994) Multiple prolactin-responsive elements mediate G1 and S phase expression of the interferon regulatory factor-1 gene, *Mol Endocrinol.*, 8(3), pp. 345-355.
- Stevenson, D., Charalambous, C. & Wilson, J.B. (2005) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (CAO) up-regulates VEGF and TGF alpha concomitant with hyperlasia, with subsequent up-regulation of p16 and MMP9, *Cancer Res*, 65(19), pp. 8826-8835.
- Stommel, J.M. & Wahl, G.M. (2005) A new twist in the feedback loop: stress-activated MDM2 destabilization is required for p53 activation, *Cell Cycle.*, 4(3), pp. 411-417. Epub 2005 Mar 2002.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. & Wahl, G.M. (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking, *Embo J.*, 18(6), pp. 1660-1672.
- Strasser, A. (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system, *Nat Rev Immunol.*, 5(3), pp. 189-200.
- Strasser, A., Harris, A.W., Jacks, T. & Cory, S. (1994) DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2, *Cell.*, 79(2), pp. 329-339.
- Strobeck, M.W., Fribourg, A.F., Puga, A. & Knudsen, E.S. (2000) Restoration of retinoblastoma mediated signaling to Cdk2 results in cell cycle arrest, *Oncogene*, 19(15), pp. 1857-1867.
- Sui, G., Affar el, B., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N.R., Yin, P., Donohoe, M., Luke, M.P., Calvo, D. & Grossman, S.R. (2004) Yin Yang 1 is a negative regulator of p53, *Cell.*, 117(7), pp. 859-872.
- Suk, K., Chang, I., Kim, Y.H., Kim, S., Kim, J.Y., Kim, H. & Lee, M.S. (2001a) Interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha synergism in ME-180 cervical cancer cell apoptosis and necrosis. IFN γ inhibits cytoprotective NF-kappa B through STAT1/IRF-1 pathways, *J Biol Chem.*, 276(16), pp. 13153-13159. Epub 12001 Jan 13118.
- Suk, K., Kim, S., Kim, Y.H., Kim, K.A., Chang, I., Yagita, H., Shong, M. & Lee, M.S. (2001b) IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death, *J Immunol.*, 166(7), pp. 4481-4489.
- 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. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, 397(6718), pp. 441-446.

- Sutherland, B.M., Bennett, P.V., Schenk, H., Sidorkina, O., Laval, J., Trunk, J., Monteleone, D. & Sutherland, J. (2001) Clustered DNA damages induced by high and low LET radiation, including heavy ions, *Phys Med.*, 17(Suppl 1), pp. 202-204.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y. & Takahashi, R. (2001) Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15), pp. 8662-8667.
- Szak, S.T., Mays, D. & Pietenpol, J.A. (2001) Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo, *Mol Cell Biol.*, 21(10), pp. 3375-3386.
- Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Klein, G. & Wiman, K.G. (1993) EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90(12), pp. 5455-5459.
- Taagepera, S., McDonald, D., Loeb, J.E., Whitaker, L.L., McElroy, A.K., Wang, J.Y. & Hope, T.J. (1998) Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(13), pp. 7457-7462.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. & Takeda, S. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells, *Embo J.*, 17(18), pp. 5497-5508.
- Takimoto, R. & El-Deiry, W.S. (2000) Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site, *Oncogene.*, 19(14), pp. 1735-1743.
- Tamura, G., Ogasawara, S., Nishizuka, S., Sakata, K., Maesawa, C., Suzuki, Y., Terashima, M., Saito, K. & Satodate, R. (1996) Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach, *Cancer Res.*, 56(3), pp. 612-615.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M.S., Aizawa, S., Mak, T.W. & Taniguchi, T. (1994) Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1, *Cell.*, 77(6), pp. 829-839.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T.W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M. & Taniguchi, T. (1996) Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage, *Nature*, 382(6594), pp. 816-818.
- Tanaka, T., Soriano, M.A. & Grusby, M.J. (2005) SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling, *Immunity.*, 22(6), pp. 729-736.
- Taniguchi, T. & Takaoka, A. (2001) A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(5), pp. 378-386.
- Taniguchi, T., Lamphier, M.S. & Tanaka, N. (1997) IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis, *Biochim Biophys Acta.*, 1333(1), pp. M9-17.
- Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A. & Ohtsubo, M. (1999) MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains, *FEBS Lett.*, 447(1), pp. 5-9.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. & Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death, *Cell*, 74(5), pp. 845-853.
- Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. & Tatton, N. (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation, *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, pp. S61-70; discussion S70-62.

- Taylor, W.R. & Stark, G.R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53, *Oncogene.*, 20(15), pp. 1803-1815.
- ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M. & Shuai, K. (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase, *Mol Cell Biol.*, 22(16), pp. 5662-5668.
- Teng, C.B., Diao, H.L., Ma, H., Cong, J., Yu, H., Ma, X.H., Xu, L.B. & Yang, Z.M. (2004a) Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) expression and activation in rat uterus during early pregnancy, *Reproduction.*, 128(2), pp. 197-205.
- Teng, C.B., Diao, H.L., Ma, X.H., Xu, L.B. & Yang, Z.M. (2004b) Differential expression and activation of Stat3 during mouse embryo implantation and decidualization, *Mol Reprod Dev.*, 69(1), pp. 1-10.
- Testa, U., Stellacci, E., Pelosi, E., Sestili, P., Venditti, M., Orsatti, R., Fragale, A., Petrucci, E., Pasquini, L., Belardelli, F., Gabriele, L. & Battistini, A. (2004) Impaired myelopoiesis in mice devoid of interferon regulatory factor 1, *Leukemia.*, 18(11), pp. 1864-1871.
- Teyssier, F., Bay, J.O., Dionet, C. & Verrelle, P. (1999) [Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation], *Bull Cancer.*, 86(4), pp. 345-357.
- Thacker, J. & Zdzienicka, M.Z. (2003) The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability, *DNA Repair (Amst)*. 2(6), pp. 655-672.
- Thacker, J. & Zdzienicka, M.Z. (2004) The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair, *DNA Repair (Amst)*. 3(8-9), pp. 1081-1090.
- Thomas, M., Finnegan, C.E., Rogers, K.M., Purcell, J.W., Trimble, A., Johnston, P.G. & Boland, M.P. (2004) STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res*, 64(22), pp. 8357-8364.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, 267(5203), pp. 1456-1462.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001) Epstein-Barr virus: exploiting the immune system, *Nat Rev Immunol*, 1(1), pp. 75-82.
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within, *Science*, 281(5381), pp. 1312-1316.
- Tinel, A. & Tschopp, J. (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress, *Science.*, 304(5672), pp. 843-846. Epub 2004 Apr 2008.
- Townsend, P.A., Scarabelli, T.M., Davidson, S.M., Knight, R.A., Latchman, D.S. & Stephanou, A. (2004) STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis, *J Biol Chem.*, 279(7), pp. 5811-5820. Epub 2003 Nov 5815.
- Tsai, C.N., Lee, C.M., Chien, C.K., Kuo, S.C. & Chang, Y.S. (1999) Additive effect of Sp1 and Sp3 in regulation of the ED-L1E promoter of the EBV LMP 1 gene in human epithelial cells, *Virology*, 261(2), pp. 288-294.
- Tsai, C.N., Tsai, C.L., Tse, K.P., Chang, H.Y. & Chang, Y.S. (2002) The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(15), pp. 10084-10089.
- Tsujimoto, Y. (1997) Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes, *Cell Death Differ.*, 4(6), pp. 429-434.
- Tuck, S.P. & Crawford, L. (1989) Characterization of the human p53 gene promoter, *Mol Cell Biol.*, 9(5), pp. 2163-2172.
- Tugizov, S.M., Berline, J.W. & Palefsky, J.M. (2003) Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells, *Nat Med*, 9(3), pp. 307-314.

- Uchihara, J.N., Krensky, A.M., Matsuda, T., Kawakami, H., Okudaira, T., Masuda, M., Ohta, T., Takasu, N. & Mori, N. (2005) Transactivation of the CCL5/RANTES gene by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1, *Int J Cancer*, 114(5), pp. 747-755.
- Uddin, S., Sassano, A., Deb, D.K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A.B., Fish, E.N. & Plataniias, L.C. (2002) Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727, *J Biol Chem.*, 277(17), pp. 14408-14416. Epub 12002 Feb 14411.
- Ulane, C.M. & Horvath, C.M. (2002) Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components, *Virology.*, 304(2), pp. 160-166.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomaki, S., Janne, O.A., Palvimo, J.J. & Silvennoinen, O. (2003) PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1, *Blood.*, 102(9), pp. 3311-3313. Epub 2003 Jul 3310.
- Utrera, R., Collavin, L., Lazarevic, D., Delia, D. & Schneider, C. (1998) A novel p53-inducible gene coding for a microtubule-localized protein with G2-phase-specific expression, *Embo J.*, 17(17), pp. 5015-5025.
- Valerie, K. & Povirk, L.F. (2003) Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair, *Oncogene.*, 22(37), pp. 5792-5812.
- Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W. & Vandenabeele, P. (1999) The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis, *Cell Death Differ.*, 6(11), pp. 1117-1124.
- Van Etten, R.A. (1999) Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl, *Trends Cell Biol.*, 9(5), pp. 179-186.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. & Thompson, C.B. (1997) Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria, *Cell*, 91(5), pp. 627-637.
- Vaziri, H. & Benchimol, S. (1996) From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging, *Exp Gerontol.*, 31(1-2), pp. 295-301.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L. & Debussche, L. (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression, *Embo J.*, 17(16), pp. 4668-4679.
- Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M. & Strasser, A. (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa, *Science.*, 302(5647), pp. 1036-1038. Epub 2003 Sep 1018.
- Vinkemeier, U., Moarefi, I., Darnell, J.E., Jr. & Kuriyan, J. (1998) Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4, *Science.*, 279(5353), pp. 1048-1052.
- Vockerodt, M., Pinkert, D., Smola-Hess, S., Michels, A., Ransohoff, R.M., Tesch, H. & Kube, D. (2005) The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation, *Int J Cancer*, 114(4), pp. 598-605.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network, *Nature*, 408(6810), pp. 307-310.
- von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S.G., Fields, S. & Bork, P. (2002) Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions, *Nature.*, 417(6887), pp. 399-403. Epub 2002 May 2008.
- Vousden, K.H. (2000) p53: death star, *Cell.*, 103(5), pp. 691-694.

- Vousden, K.H. (2002) Switching from life to death: the Miz-ing link between Myc and p53, *Cancer Cell.*, 2(5), pp. 351-352.
- Wakisaka, N., Murono, S., Yoshizaki, T., Furukawa, M. & Pagano, J.S. (2002) Epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces and causes release of fibroblast growth factor-2, *Cancer Res*, 62(21), pp. 6337-6344.
- Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells, *Cell*, 43(3 Pt 2), pp. 831-840.
- Wang, F., Tsang, S.F., Kurilla, M.G., Cohen, J.I. & Kieff, E. (1990) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1, *J Virol*, 64(7), pp. 3407-3416.
- Wang, H., Wang, M., Bocker, W. & Iliakis, G. (2005) Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors, *J Cell Physiol.*, 202(2), pp. 492-502.
- Wang, I.M., Blanco, J.C., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. & Ozato, K. (1996) Interferon regulatory factors and TFIIB cooperatively regulate interferon-responsive promoter activity in vivo and in vitro, *Mol Cell Biol.*, 16(11), pp. 6313-6324.
- Wang, J.Y. (2000) Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase, *Oncogene*, 19(49), pp. 5643-5650.
- Wang, Q. & Floyd-Smith, G. (1997) The p69/71 2-5A synthetase promoter contains multiple regulatory elements required for interferon-alpha-induced expression, *DNA Cell Biol.*, 16(12), pp. 1385-1394.
- Wang, X., Kenyon, W.J., Li, Q., Mullberg, J. & Hutt-Fletcher, L.M. (1998) Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells, *J Virol*, 72(7), pp. 5552-5558.
- Wang, Y., Wu, T.R., Cai, S., Welte, T. & Chin, Y.E. (2000) Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation, *Mol Cell Biol.*, 20(13), pp. 4505-4512.
- Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L. & Halazonetis, T.D. (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins, *Nat Genet.*, 19(2), pp. 175-178.
- Weber, J.D., Jeffers, J.R., Rehg, J.E., Randle, D.H., Lozano, G., Roussel, M.F., Sherr, C.J. & Zambetti, G.P. (2000) p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor, *Genes Dev.*, 14(18), pp. 2358-2365.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J. & Bar-Sagi, D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53, *Nat Cell Biol.*, 1(1), pp. 20-26.
- Weber-Nordt, R.M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R. & Finke, J. (1996) Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines, *Blood.*, 88(3), pp. 809-816.
- Webster, G.A. & Perkins, N.D. (1999) Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53, *Mol Cell Biol*, 19(5), pp. 3485-3495.
- Wei, G., Li, A.G. & Liu, X. (2005) Insights into selective activation of p53 DNA binding by c-Abl, *J Biol Chem*, 280(13), pp. 12271-12278. Epub 12005 Jan 12220.
- Wei, Y., Fox, T., Chambers, S.P., Sintchak, J., Coll, J.T., Golec, J.M., Swenson, L., Wilson, K.P. & Charifson, P.S. (2000) The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity, *Chem Biol*, 7(6), pp. 423-432.
- Weinberg, R.A. (1985) The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus, *Science.*, 230(4727), pp. 770-776.

- Weinberg, R.A. (1994) Oncogenes and tumor suppressor genes, *CA Cancer J Clin.*, 44(3), pp. 160-170.
- Welch, P.J. & Wang, J.Y. (1993) A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle, *Cell.*, 75(4), pp. 779-790.
- Wen, S.T. & Van Etten, R.A. (1997) The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity, *Genes Dev.*, 11(19), pp. 2456-2467.
- Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J.E., Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation, *Cell.*, 82(2), pp. 241-250.
- Wesemann, D.R. & Benveniste, E.N. (2003) STAT-1 alpha and IFN-gamma as modulators of TNF-alpha signaling in macrophages: regulation and functional implications of the TNF receptor 1:STAT-1 alpha complex, *J Immunol.*, 171(10), pp. 5313-5319.
- Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, N.L., Jarpe, M.B. & Johnson, G.L. (1998) MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis, *Mol Cell Biol*, 18(4), pp. 2416-2429.
- Wilhelm, S., Wagner, H. & Hacker, G. (1998) Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells, *Eur J Immunol.*, 28(3), pp. 891-900.
- Willers, H., Husson, J., Lee, L.W., Hubbe, P., Gazemeier, F., Powell, S.N. & Dahm-Daphi, J. (2006) Distinct mechanisms of nonhomologous end joining in the repair of site-directed chromosomal breaks with noncomplementary and complementary ends, *Radiat Res.*, 166(4), pp. 567-574.
- Willman, C.L., Sever, C.E., Pallavicini, M.G., Harada, H., Tanaka, N., Slovak, M.L., Yamamoto, H., Harada, K., Meeker, T.C., List, A.F. & et al. (1993) Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia, *Science.*, 259(5097), pp. 968-971.
- Wilson, D.M., 3rd, Sofinowski, T.M. & McNeill, D.R. (2003) Repair mechanisms for oxidative DNA damage, *Front Biosci.*, 8, pp. d963-981.
- Woodring, P.J., Litwack, E.D., O'Leary, D.D., Lucero, G.R., Wang, J.Y. & Hunter, T. (2002) Modulation of the F-actin cytoskeleton by c-Abl tyrosine kinase in cell spreading and neurite extension, *J Cell Biol.*, 156(5), pp. 879-892. Epub 2002 Feb 2025.
- Wu, D.Y., Kalpana, G.V., Goff, S.P. & Schubach, W.H. (1996) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1, *J Virol.*, 70(9), pp. 6020-6028.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. & el-Deiry, W.S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene, *Nat Genet*, 17(2), pp. 141-143.
- Wu, T.R., Hong, Y.K., Wang, X.D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., Campbell, A.G., Han, Z.Y., Feng, G.S. & Chin, Y.E. (2002) SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei, *J Biol Chem.*, 277(49), pp. 47572-47580. Epub 42002 Sep 47522.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 284(5756), pp. 555-556.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. & Dunlop, D. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis, *J Pathol*, 142(1), pp. 67-77.
- Xiang, J., Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. (1996) BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(25), pp. 14559-14563.

- Xiao, G., Chicas, A., Olivier, M., Taya, Y., Tyagi, S., Kramer, F.R. & Bargonetti, J. (2000) A DNA damage signal is required for p53 to activate gadd45, *Cancer Res.*, 60(6), pp. 1711-1719.
- Xu, X., Fu, X.Y., Plate, J. & Chong, A.S. (1998) IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression, *Cancer Res.*, 58(13), pp. 2832-2837.
- Yakovlev, A.G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B. & Faden, A.I. (2004) BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis, *J Biol Chem.*, 279(27), pp. 28367-28374. Epub 22004 Apr 28321.
- Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N. & Yamamoto, N. (2000) Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs, *FEBS Lett*, 484(2), pp. 153-158.
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B. (2001) Role of the NF-kappaB pathway in the pathogenesis of human disease states, *Curr Mol Med.*, 1(3), pp. 287-296.
- Yang, A., Kaghad, M., Caput, D. & McKeon, F. (2002) On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53, *Trends Genet.*, 18(2), pp. 90-95.
- Yang, E., Henriksen, M.A., Schaefer, O., Zakharova, N. & Darnell, J.E., Jr. (2002) Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant, *J Biol Chem.*, 277(16), pp. 13455-13462. Epub 12002 Feb 13457.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. & Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science*, 275(5303), pp. 1129-1132.
- Yang, J., Xu, Z.P., Huang, Y., Hamrick, H.E., Duerksen-Hughes, P.J. & Yu, Y.N. (2004a) ATM and ATR: sensing DNA damage, *World J Gastroenterol.*, 10(2), pp. 155-160.
- Yang, Y., Li, C.C. & Weissman, A.M. (2004b) Regulating the p53 system through ubiquitination, *Oncogene.*, 23(11), pp. 2096-2106.
- Yang, Y.L. & Li, X.M. (2000) The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities, *Cell Res.*, 10(3), pp. 169-177.
- Yonish-Rouach, E., Deguin, V., Zaitchouk, T., Breugnot, C., Mishal, Z., Jenkins, J.R. & May, E. (1995) Transcriptional activation plays a role in the induction of apoptosis by transiently transfected wild-type p53, *Oncogene.*, 11(11), pp. 2197-2205.
- Yoon, H., Liyanarachchi, S., Wright, F.A., Davuluri, R., Lockman, J.C., de la Chapelle, A. & Pellegata, N.S. (2002) Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(24), pp. 15632-15637. Epub 12002 Nov 15615.
- Yoshida, K. & Miki, Y. (2005) Enabling death by the Abl tyrosine kinase: mechanisms for nuclear shuttling of c-Abl in response to DNA damage, *Cell Cycle.*, 4(6), pp. 777-779. Epub 2005 Jun 2014.
- Yoshida, K. (2007) Regulation for nuclear targeting of the Abl tyrosine kinase in response to DNA damage, *Adv Exp Med Biol.*, 604, pp. 155-165.
- You, M., Yu, D.H. & Feng, G.S. (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway, *Mol Cell Biol.*, 19(3), pp. 2416-2424.
- Young, L.S. & Rickinson, A.B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on, *Nat Rev Cancer*, 4(10), pp. 757-768.
- Young, L.S., Dawson, C.W. & Eliopoulos, A.G. (1999) Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways, *Biochem Soc Trans.*, 27(6), pp. 807-812.
- Young, L.S., Dawson, C.W. & Eliopoulos, A.G. (2000) The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes, *Mol Pathol*, 53(5), pp. 238-247.

- Yuan, S.S., Chang, H.L. & Lee, E.Y. (2003) Ionizing radiation-induced Rad51 nuclear focus formation is cell cycle-regulated and defective in both ATM(-/-) and c-Abl(-/-) cells, *Mutat Res.*, 525(1-2), pp. 85-92.
- Yuan, Z.M., Huang, Y., Fan, M.M., Sawyers, C., Kharbanda, S. & Kufe, D. (1996) Genotoxic drugs induce interaction of the c-Abl tyrosine kinase and the tumor suppressor protein p53, *J Biol Chem*, 271(43), pp. 26457-26460.
- Yuan, Z.M., Huang, Y., Ishiko, T., Kharbanda, S., Weichselbaum, R. & Kufe, D. (1997) Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94(4), pp. 1437-1440.
- Yuan, Z.M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y.Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R. & Kufe, D. (1999) p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage, *Nature*, 399(6738), pp. 814-817.
- Zambetti, G.P., Bargonetti, J., Walker, K., Prives, C. & Levine, A.J. (1992) Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element, *Genes Dev.*, 6(7), pp. 1143-1152.
- Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. & Kroemer, G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis, *J Exp Med*, 183(4), pp. 1533-1544.
- Zauberman, A., Lupo, A. & Oren, M. (1995) Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites, *Oncogene.*, 10(12), pp. 2361-2366.
- Zeng, X., Chen, L., Jost, C.A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W.G., Jr., Oren, M., Chen, J. & Lu, H. (1999) MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation, *Mol Cell Biol.*, 19(5), pp. 3257-3266.
- Zhang, L. & Pagano, J.S. (2002) Structure and function of IRF-7, *J Interferon Cytokine Res*, 22(1), pp. 95-101.
- Zhang, X., Blenis, J., Li, H.C., Schindler, C. & Chen-Kiang, S. (1995) Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes, *Science.*, 267(5206), pp. 1990-1994.
- Zhang, X., Uthaisang, W., Hu, L., Ernberg, I.T. & Fadeel, B. (2005) Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 promotes stress-induced apoptosis upstream of caspase-2-dependent mitochondrial perturbation, *Int J Cancer*, 113(3), pp. 397-405.
- Zhang, Y. & Xiong, Y. (2001) A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation, *Science.*, 292(5523), pp. 1910-1915.
- Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W.G. (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways, *Cell*, 92(6), pp. 725-734.
- Zhao, E.G., Song, Q., Cross, S., Misko, I., Lees-Miller, S.P. & Lavin, M.F. (1998) Resistance to etoposide-induced apoptosis in a Burkitt's lymphoma cell line, *Int J Cancer*, 77(5), pp. 755-762.
- Zhao, X.R., Gu, H.H., Weng, X.X., Yi, W., Deng, X.Y. & Cao, Y. (2000) The Primary Study on Expression and Function of D-Type Cyclins in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines, *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 32(2), pp. 192-196.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S.H. & Prives, C. (2001) A role for p53 in base excision repair, *Embo J.*, 20(4), pp. 914-923.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V.M. & Salvesen, G.S. (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases, *J Biol Chem*, 272(12), pp. 7797-7800.

- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J.J., Chen, L. & Hayward, S.D. (2000) A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters, *J Virol.*, 74(4), pp. 1939-1947.
- Zhu, M., John, S., Berg, M. & Leonard, W.J. (1999) Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling, *Cell.*, 96(1), pp. 121-130.
- Zhu, S., Waguespack, M., Barker, S.A. & Li, S. (2007) Doxorubicin directs the accumulation of interleukin-12 induced IFN γ into tumors for enhancing STAT1 dependent antitumor effect, *Clin Cancer Res.*, 13(14), pp. 4252-4260.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J. & Rousel, M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization, *Genes Dev.*, 12(15), pp. 2424-2433.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell*, 90(3), pp. 405-413.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, *J Biol Chem.*, 274(17), pp. 11549-11556.

RESUME

STAT1 et p53 sont deux facteurs de transcription suppresseur de tumeur, impliqués dans la régulation de la mort cellulaire. L'EBV est le premier virus transformant identifié chez l'homme. Il est associé à de nombreux lymphomes. L'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV implique la mise en jeu et le détournement de facteurs transcriptionnels cellulaires tels que NF- κ B, STAT1 et p53 grâce aux protéines de latence de ce virus.

Le point de départ de mon travail était d'étudier des cibles transcriptionnelles activées par l'EBV et leur action sur la prolifération des lymphocytes B immortalisés par l'EBV. Puis nous nous sommes intéressés à l'étude de la relation entre p53 et STAT1 au niveau fonctionnel et structurel et dans un contexte génotoxique provoqué par les médicaments anti-cancéreux.

Nous avons clairement montré dans notre modèle de lymphocyte B immortalisés par l'EBV en latence III, que le facteur de transcription NF- κ B possède un rôle central dans la signalisation de LMP1. L'activation constitutive de STAT1 par LMP1, dans ces lymphocytes B EBV+, est due à une boucle autocrine des interférons, ces derniers étant induits en expression par NF- κ B. L'activation de ces trois facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et p53, régule l'expression de Fas à la surface cellulaire des lymphocytes B infectés par l'EBV, permettant de sensibiliser ces cellules à l'apoptose. Du point de vue de l'équilibre virus/hôte, ce processus permettrait l'élimination des lymphocytes B infectés par l'EBV restés en latence III, par le système immunitaire. Ainsi, LMP1 est capable d'induire à la fois la voie anti-apoptotique NF- κ B et les deux voies pro-apoptotiques STAT1 et p53.

L'étude de la relation entre p53 et STAT1 a montré que les médicaments chimiothérapeutiques activent STAT1 d'une façon dépendante du domaine central de fixation à l'ADN de p53, indépendamment de son activité transcriptionnelle. Nous avons, ainsi, mis en évidence une nouvelle voie d'activation de STAT1 qui dépend de p53 et implique la tyrosine kinase c-Abl. Le modèle proposé suggère que le stress génotoxique favorise la formation d'un complexe transitoire p53/STAT1/c-Abl dont la plateforme est ATM. Au plan fonctionnel, nous avons montré que les deux voies JAK/STAT1 et p53 synergisent pour induire l'apoptose et que la Doxorubicine sensibilise les cellules à l'apoptose induite par de faibles doses d'interférons.

La compréhension du rôle des facteurs protéiques p53 et STAT1 de façon isolée et en combinatoire dans le contrôle de la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules permettrait une meilleure approche du processus tumoral ainsi que la réponse à aux traitements notamment la chimiothérapie.