



Effets inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sur l'activité de p53

Thèse présentée par **Ana Sofia Silva Gallardo** en vue de l'obtention
du grade de docteur en sciences

Promoteur : Pr. Patrick Dumont (UCL-ISV, BE)

Membres du jury : Dr. Vanessa Bol (UCL-IREC, BE)

Pr. Florence Chainiaux (UNamur, URBC, BE)

Pr. Philippe Juin (Université de Nantes, FR)

Pr. Bernard Knoops (UCL-ISV, BE)

Pr. René Rezsöhazy (UCL-ISV, BE)

Président du jury: Pr. Claude Remacle (UCL-ISV, BE)

Novembre 2014

Remerciements

En préambule à ce manuscrit, je souhaite exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de la présente thèse. C'est en arrivant au bout du chemin que l'on peut apprécier la distance parcourue et se réjouir d'avoir été accompagnée, guidée et soutenue tout au long de cette aventure.

Je voudrais remercier en tout premier lieu mon promoteur de thèse, le professeur Patrick Dumont. Merci de m'avoir proposé et encouragé à travailler avec vous. Merci de m'avoir démystifié, fait découvrir - et aimer ! - la biologie moléculaire. Merci pour votre expertise dans le domaine de p53. Merci pour votre aide technique. Merci pour vos conseils judicieux durant ces cinq dernières années.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité d'encadrement, constitué des professeurs Bernard Knoops et René Rezsöhazi. Merci pour votre enthousiasme, votre soutien humain, votre savoir-faire, votre rigueur et vos précieux conseils. Sans nul doute, vous avez apporté une importante contribution dans ce travail. Je retiendrai surtout la confiance que vous m'avez accordée.

Mes remerciements vont également à Pierre et Liliana. Vous aussi avez apporté votre pierre à l'édifice et nous avons pu découvrir ensemble les chemins tortueux qui passent de la théorie à la pratique en laboratoire. Vous encadrer a été pour moi un réel plaisir et l'expérience que nous avons partagée m'a appris énormément.

Je remercie également tous les membres de mon jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit. Votre regard critique et vos remarques constructives, chacun dans vos domaines d'expertise, ont permis de grandement l'améliorer. Je voudrais également remercier en particulier le président du jury, le Professeur Claude Remacle, chez qui j'ai eu la chance de réaliser mon mémoire sous la tutelle du Docteur Vanessa Bol que je remercie aussi. En effet, c'est grâce à vous, au goût de la recherche que vous m'avez légué, que j'ai entrepris la réalisation de cette thèse. Je remercie aussi le Professeur Philippe Juin, qui a accepté avec enthousiasme de faire

partie de ce jury de thèse, sans connaître au préalable les participants. Faire votre connaissance a été très enrichissant pour moi. Merci d'avoir entrepris ce voyage et j'espère que cette rencontre sera le début d'une nouvelle collaboration entre nos deux labos. Enfin, je remercie le Professeur Florence Chainiaux pour ses conseils avisés lors de la défense privée.

Loin du rat de bibliothèque (auquel on peut se comparer lors de la rédaction de la thèse), le doctorat en sciences est avant tout un travail au labo. C'est pourquoi je voudrais à présent remercier tous ceux que j'ai cotoyés dans les couloirs du laboratoire CELL. Merci à tous pour cette ambiance entraînante, si propice au travail et à l'entre-aide, qui règne sur ce plateau.

A vous avec qui nous avons partagé le même bureau pendant plus ou moins longtemps, merci d'avoir supporté (avec plus ou moins de tolérance) ma toux lors des moments stressants, d'avoir transformé ce lieu de travail en un lieu chaleureux où il fait bon rire. Merci à vous, Benoît et Konstantin, d'avoir égayé le bureau avec vos conversations qui souvent tournent à l'absurde, merci d'avoir partagé une tranche de vie avec moi. Merci à toi André pour tous les conseils que tu m'as prodigués depuis mon mémoire, merci pour ton expérience que tu as volontiers partagé - à plusieurs reprises - avec moi.

En particulier, merci Benjamin et Cedric d'avoir créé un noyau de doctorants solidaires au sein du groupe « Patrick Dumont ». Merci d'avoir pris soin de moi pendant mes deux grossesses en me chassant du labo lorsque vous manipulez des produits dangereux. Merci pour votre aide précieuse lorsque j'étais en béquilles, le genou coincé dans une atelle. Merci d'avoir partagé avec moi votre expérience et pour tous les échanges d'idées que nous avons eus.

Merci à vous, Daniel et Willy, pour votre bienveillance vis-à-vis du maintien du labo, vous êtes les petites mains discrètes et efficaces qui permettent un fonctionnement optimal de notre plateau. Un grand merci à toi Véronique, pour tous ces moments partagés et pour toute ton aide administrative. Merci à vous, Professeur Gofflot, Geoffroy, Sarah, Bertrand, Coralie pour les bons moments passés autour d'une table, celle de la cafet du labo, du Galilée (avec beaucoup de poivre) ou bien pendant les BBQ du labo. Merci Marc pour les quelques semaines où nous avons partagé le « bureau de

rédaction », pour ton amabilité et ton aide précieuse dans la langue de Shakespeare. A vous, Eleonore, Julie, Nicolas et Valérie, qui êtes déjà partis du labo mais qui m’avez inspiré dans cette voie, merci.

A vous, Wendy et Oksana, merci pour votre amitié. Merci à toi Oksana pour toutes les conversations partagées autour de nos sujets favoris : notre thèse, nos enfants, nos maris ! Merci à toi Wendy pour ton aide et tes conseils lors de tous les moments difficiles au labo comme dans la vie privée. Merci à vous deux pour les bons moments que nous avons partagés et, je l’espère de tout cœur, partagerons encore !

Enfin, j’adresse un remerciement plus personnel à ma famille. A mon mari Nicolas pour m’avoir si bien soutenue et choyée tout au long de ces années d’études, faisant sien mon propre stress aux moments clé de ma carrière d’étudiante. A mes parents de m’avoir permis de suivre ma voie en Biologie, au sein de l’Université Catholique de Louvain. A mon grand-père Mario de m’avoir fait découvrir le plaisir d’étudier. A mes enfants Arthur et Léonard, d’avoir réussi à me changer les idées chaque soir, en rentrant à la maison.

A tous, merci.

Table des matières

Résumé	III
Liste des abréviations	V
INTRODUCTION.....	1
Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53	3
1.1. Cancer et p53	10
1.2. Les voies d'activation de p53 suite aux dommages de l'ADN...	15
1.3. Translocation mitochondriale de p53.....	18
1.4. Modifications post-traductionnelles de p53.....	20
Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose	23
2.1. Introduction à l'apoptose	23
2.2. Les deux voies apoptotiques.....	26
2.3. La mitochondrie	28
2.4. La voie des caspases	30
2.5. Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.....	33
2.6. Fonctions de p53 à la mitochondrie	35
Chapitre 3 : La famille de Bcl-2	39
3.1. Présentation des différents membres de la famille Bcl-2.....	43
3.2. Localisation des membres de la famille de Bcl-2	54
3.3. Régulation du niveau et de l'activité des membres de la famille de Bcl-2	56
3.4. Régulation du cycle cellulaire par les membres de la famille de Bcl-2	57
3.5. Régulation du PTP par les membres de la famille de Bcl-2	57
3.6. Cancer et famille de Bcl-2	59
Chapitre 4 : Etat de l'art sur p53 et la famille Bcl-2.....	67

Table des matières

4.1. Interaction avec les membres pro-apoptotiques	68
4.2. Interaction avec les membres anti-apoptotiques.....	70
OBJECTIFS.....	77
RESULTATS	83
Chapitre 1 : Production de la protéine Mcl-1 et clones surexprimant Mcl-1	85
1.1. Introduction	87
1.2. Matériel et méthodes	89
1.3. Résultats.....	92
1.4. Discussion	104
Chapitre 2 : L'expression de Bcl-2 et Bfl-1 diminue l'apoptose dépendante de p53 et régule sa localisation subcellulaire (Article à soumettre)	107
Introduction	112
Materials and Methods.....	115
Results.....	119
Discussion	132
DISCUSSION GENERALE	137
1. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, éléments pro-oncogéniques.....	139
2. Aspects déterminants dans le potentiel anti-apoptotique.....	141
3. Conclusions générales et perspectives	147
BIBLIOGRAPHIE	151

Résumé

Le suppresseur de tumeur p53 peut provoquer l'entrée en apoptose directement au niveau des mitochondries. En effet, il interagit avec Bak, un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 présent constitutivement à la membrane mitochondriale externe. En induisant un changement de conformation de Bak, p53 provoque son oligomérisation. Cela résulte en la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe et la libération des effecteurs mitochondriaux de l'apoptose.

La famille de Bcl-2 est constituée de trois classes de protéines, dont les membres anti-apoptotiques: Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1/A1 et Bcl-w. Ces protéines sont fréquemment surexprimées dans le cancer, ce qui renforce la résistance des cellules aux traitements thérapeutiques. Le but de cette thèse est d'analyser la façon dont les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 affectent l'activité pro-apoptotique de p53.

Pour cela, les interactions protéiques entre les différents membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et le suppresseur de tumeur p53 ont été examinées. Parmi ces protéines, nous avons mis en évidence des interactions entre Bcl-2, Bcl-xl, Bfl-1 et Bcl-w d'une part, et p53 d'autre part.

Après avoir établi ces interactions, de nouvelles expériences réalisées ont permis d'identifier des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 capables d'inhiber l'apoptose dépendante de p53. Des cellules surexprimant les membres Bcl-2, Bfl-1 et Bcl-w ont été soumises à des stress connus pour induire l'apoptose dépendante de p53. Nous avons établi que Bcl-2 et Bfl-1 protégeaient significativement la cellule contre ces facteurs tandis que Bcl-w n'octroyait aucune protection significative.

La réalisation de cinétiques de translocation mitochondriale de p53 suite à une exposition aux UV-B a montré que la surexpression de Bcl-2 et Bfl-1 augmente la translocation mitochondriale et cytosolique de p53 tout en inhibant le processus apoptotique dépendant de p53.

Liste des abréviations

ACINUS	Apoptotic Chromatin condensation Inducer in the Nucleus
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Amp	Ampicilline
ANOVA	Analysis Of Variance
ANT	Adenin Nucleotide Translocator
APAF-1	Apoptosis Protease-Activating Factor 1
APR-246	Protéine analogue de PRIMA-1
ARF	Alternate Reading Frame
Arg	Arginine
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM- and Rad3-related
Bad	Bcl-2 Antagonist of cell Death
Bak	Bcl-2 Antagonist Killer 1
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2	B Cell Lymphoma 2
Bcl-w	Bcl-2 like 2
Bcl-xl	B Cell Lymphoma extra-large
Bfl-1/A1	Bcl-2 related gene A1
BFR	Boucle Flexible de Régulation
BH	Bcl-2 Homology domain
Bid	BH3 Interacting Domain death agonist
Bik	Bcl-2 Interacting Killer
Bim	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
BIR	Baculoviral Inhibitors of apoptosis protein Repeats
BMF	Bcl-2 Modifying Factor
BMH	bis-maleimidohexane
bNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
Bok	Bcl-2 related Ovarian Killer
BOPs	BH3 Only Proteins
BRCA1	Breast Cancer 1

Liste des abréviations

BSA	Bovine Serum Albumin
BTP	BSA/Tween/PBS
CAD	Caspase-Activated DNase
CD95/Fas	Cluster of Differentiation 95/Fas receptor
CDB	Cassures Double Brin de l'ADN
CDC25C	Cell Division Cycle 25C
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKN1A	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1A
CDS	CDP-diacylglycerol synthase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHK1 ou 2	Checkpoint Kinase 1 ou 2
CICD	Caspase Independent Cell Death
Cre-LoxP	Recombinase Cre qui recombine des paires de séquences cible Lox
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
dATP	désoxyAdénosine TriPhosphate
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
DLP1	Dynamin-Like Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EndoG	Endonucléase G
ER	Element de Reconnaissance
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases,
FBS	Fetal Bovine Serum
FH	Follicular Helper cells
Fis1	Mitochondrial fission 1 protein
FPA	Fluorescent Polarization Assay
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
G1	Phase du cycle cellulaire: croissance cellulaire
G2	Pase du cycle cellulaire: pré-mitose
GLUT1	Transporteur de glucose de type 1

Liste des abréviations

GLUT4	Transporteur de glucose de type 4
GRS	Glasgow Rearranged Sequence
GST	Glutathion-S-Transférase
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HAUSP	Herpesvirus-Associated Ubiquitin-Specific Protease
HCT116	Human Colon cancer cells
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPVs	Human PapillomaVirus
HRK	Activator of apoptosis harakiri
HSP60	Heat-Shock Protein 60
Htra2	High temperature requirement factor 2
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC50	concentration inhibitrice médiane
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated DNase
IGFBP1	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 1
InsP3	Inositol triPhosphate
IPTG	IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside
kDa	kiloDaltons
KO	Knock Out
LB	Lysogeny Broth
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCIC	Mort Cellulaire Indépendante des Caspases
Mcl-1	Myeloid cell factor 1
MDM2 (4)	Mouse Double Minute 2 (4) homolog
MDR1	Multi-Drug Resistance 1
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
MQ	methylene quinuclidinone
MRE11	Meiotic Recombination 11 homolog A
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome protein 1
NES	Nuclear Exportation Sequence
NLS	Nuclear Localisation Sequence

Liste des abréviations

Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NuMA	Nuclear Matrix protein
Omi/HtrA2	High temperature requirement protein A2
OMM	Outer Mitochondial Membrane
OXPPOS	Phosphorylation oxydative
PA1	Human ovarian teratocarcinoma cell line
PARC	Parkin-like ubiquitin ligase
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)Polymérase-1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	PBS/Tween
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGS	PhosphatidylGlycerophosphate Synthase
PI-3K-AKT	PhosphoInositide3-Kinase-serine/threonine protein Kinase B
PIDD	p53-Induced protein with a Death Domain
PMME	Perméabilisation de la Membrane Mitochondriale Externe
PR	Domaine Riche en Proline
PRDX3	Peroxyredoxin-3
PRIMA-1	p53 Re-activation and Induction of Massive Apoptosis
Pro	Proline
PTP	Permeabilisation Transition Pore
Puma	p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis
RAD50	DNA repair protein
RIP	Receptor interacting protein
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
RNA	RiboNucleic Acid
ROS	Reactive oxygen species
rtTA	Reverse tetracycline controlled TransActivator
S	Phase du cycle cellulaire: réplication de l'ADN
SAOS 2	Sarcoma Osteogenic cells
SARbyNMR	Méthode basée sur la résonnance magnétique nucléaire
SCO2	Synthèse de Cytochrome c Oxydase 2
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyArylamide Gel
SEM	Standard Error Means

Liste des abréviations

siRNA	Small interfering RNA
SMAC	Second Mitochondrial derived Activator of Caspases
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
SV40-Tag	Simian Virus 40 large T antigen
TAD	Domaine de TransActivation
TBE	Tris/Borate/EDTA
tBid	Bid tronqué
TIGAR	TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator
TM	Domaine TransMembrannaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
U2OS	Human osteosarcoma cell line
UVB	Ultra-Violets B (longueur d'onde moyenne)
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel

Liste des abréviations

INTRODUCTION

Introduction

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

La protéine p53 a été découverte en 1979, à la fois par David Lane et Arnold Levine. Leur sujet de recherche était le virus SV40 (simian virus 40) et ils avaient remarqué que l'infection des cellules par le virus stimulait la production d'une protéine de 53 kDa. Cette protéine était immunoprécipitée avec l'antigène viral dans différents types cellulaires issus de différents animaux (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Les niveaux importants de cette protéine dans les cellules cancéreuses fut la première caractéristique répertoriée de cette protéine. Cette caractéristique a amené l'hypothèse selon laquelle p53 promeut le cancer.

Ce n'est que fin des années quatre-vingts que p53 se révèle être en réalité un suppresseur de tumeur. En effet, c'est à cette époque que les chercheurs comprennent que les fonctions oncogéniques ne sont attribuées qu'aux mutants de p53 issus de clones dérivés de tumeurs. En étudiant la séquence du gène *TP53* sauvage de la souris, la communauté scientifique réalise que les expériences précédentes employaient en réalité une version mutante de la protéine (Brosh and Rotter, 2009; Weisz *et al.*, 2007). A ce jour, cette protéine fait l'objet de plus de 73.200 articles (une recherche dans la base de données Pubmed, en introduisant le mot clé « p53 », indique plus de 73.200 résultats en Octobre 2014).

Le gène humain *TP53* codant pour la protéine p53 est situé sur le bras court du chromosome 17 (17p13) (Lacroix *et al.*, 2006). Facteur de transcription nucléaire de 43,7 kDa, son nom fait référence au poids moléculaire apparent de la protéine, qui migre à 53 kDa dans un gel SDS-PAGE. Ce phénomène est dû au grand nombre de résidus proline que contient p53, ce qui rend sa migration plus lente (Levine and Oren, 2009).

Le gène *TP53* appartient à une petite famille de protéines qui comprend, chez les mammifères, deux autres paralogues : *TP63* et *TP73*. Les protéines correspondantes p63 et p73 sont structurellement et fonctionnellement semblables à p53. Facteurs de transcription, leur activité est régulée par un large répertoire de modifications post-traductionnelles communes aux trois protéines, et par des interactions avec des cofacteurs régulateurs. Les protéines p63 et p73 ont des fonctions importantes dans le développement et la différenciation embryonnaires. Elles sont aussi impliquées dans la suppression des tumeurs (Costanzo *et al.*, 2014). Par exemple, elles peuvent être activées lorsque l'ADN est endommagé, induisant la mort cellulaire en présence ou absence de p53 (Schmitt *et al.*, 2007). Les gènes *TP63* et *TP73* donnent lieu à de multiples isoformes, à cause de promoteurs et d'épissages alternatifs multiples (Joerger *et al.*, 2009). Ceci engendre des protéines aux propriétés antagonistes, agissant comme des suppresseurs de tumeur ou comme des proto-oncogènes. La famille p53 constitue un réseau de signalisation qui intègre des signaux métaboliques, de développement et de stress. Grâce à ce réseau, cette famille contrôle le métabolisme, la différenciation, la longévité, la prolifération et la mort cellulaire (Costanzo *et al.*, 2014).

Au sein de la population humaine, il existe différentes formes de p53. Ainsi, on peut distinguer les polymorphes Arg72 et Pro72 qui, comme leur nom l'indique, possèdent une arginine ou une proline à la position 72. Le variant Arg72 possède une capacité bien plus marquée à induire l'apoptose mitochondriale que le variant Pro72 (Dumont *et al.*, 2003). Un autre type de polymorphisme touche moins de 5% de la population Afro-américaine. Ce polymorphisme concerne la proline en position 47 qui est remplacée par une sérine. Ceci compromet la phosphorylation de la sérine 46, diminuant la capacité de la protéine à induire l'apoptose et à transactiver certains gènes (Li *et al.*, 2005).

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

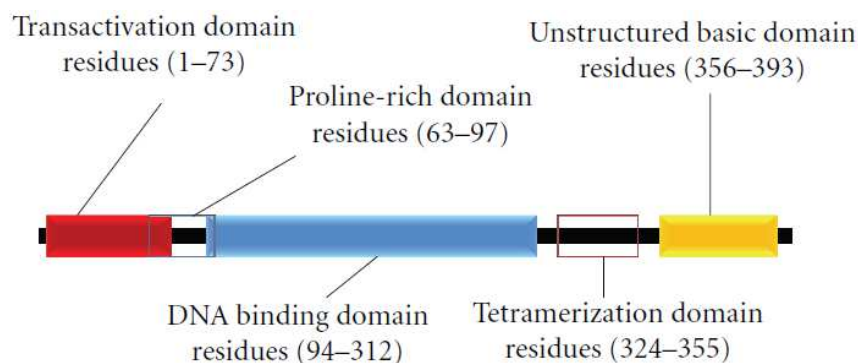


Figure 1: Domaines de p53.

Le monomère de p53 comprend différents domaines multifonctionnels. Le domaine de transactivation N-terminal est subdivisé en TAD1 et TAD2, dont les fonctions diffèrent (Résidus 1-40 et 41-73). Le domaine riche en proline (résidus 63-97) sépare le domaine de transactivation du domaine hautement conservé de liaison à l'ADN (résidus 94-312). Enfin, le domaine de tétramérisation (résidus 324-355) précède le domaine C-terminal (résidus 360-393). (Robbins and Zhao, 2012)

La protéine p53 possède un domaine de transactivation N-terminal (TAD, TransActivation Domain), subdivisé en TAD1 et TAD2 (résidus 1-40 et 41-73). Vient ensuite un domaine riche en proline (PR, résidus 63-94) et un domaine central de liaison à l'ADN hautement conservé au sein de la famille p53 (DBD, DNA-Binding Domain, résidus 94-312), un domaine d'oligomérisation (résidus 324-355) et un domaine C-terminal (résidus 356-393) (Brosh and Rotter, 2009; Ha *et al.*, 2013; Sot *et al.*, 2007), (**Figure 1**).

TAD est subdivisé en TAD1 et TAD2 suite à l'étude de quatre mutations de p53 dans ce domaine, menée par l'équipe de Venot (Venot *et al.*, 1999). Les chercheurs ont étudié d'une part le double mutant Q22 et S23, caractérisant TAD1, et le double mutant Q53 et S54 caractérisant TAD2 d'autre part. Le premier double mutant est incapable de transactiver les promoteurs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire tandis que la transactivation des promoteurs impliqués dans l'apoptose est atténuée. Le double mutant caractérisant TAD2 entraîne une transactivation atténuée de tous les promoteurs. Le mutant Q22 et S23, contrairement au mutant Q53 et S54, altère même la dégradation de p53 et l'inhibition de MDM2 (Mouse Double

Minute 2 homolog), principal inhibiteur de p53. La mutation simultanée des quatre résidus entraîne l'inhibition complète de toutes les activités de transactivation de p53 (Venot *et al.*, 1999). Chacun de ces sous-domaines possède un motif $\Phi XX\Phi\Phi$ (Φ correspond à un résidu volumineux hydrophobe et X représente n'importe quel résidu). Ces motifs facilitent le recrutement de partenaires protéiques et il existe une compétition pour la liaison avec le TAD1 ou le TAD2. La présence de ces deux motifs au sein du TAD permet également la formation de complexes ternaires avec différents partenaires protéiques. Ces différentes possibilités d'interaction avec la protéine permettent une régulation coopérative de p53 (Ha *et al.*, 2013).

Le domaine riche en proline PR comprend des motifs PXXP (P correspond à un résidu proline et X représente n'importe quel résidu). L'induction de l'apoptose par une protéine p53 déléetée du PR est sérieusement compromise, bien que la protéine soit encore capable de transactiver des gènes pro-apoptotiques tels que celui codant pour Bax (Baptiste *et al.*, 2002; Sakamuro *et al.*, 1997). De plus, le PR de p53 est nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à la sénescence et réparation de l'ADN suite à une radiation chez la souris (Campbell *et al.*, 2013). L'étude du polymorphisme au niveau de la position 72 a révélé que le domaine PR est essentiel à l'apoptose indépendante de la transcription, induite par p53 (Dumont *et al.*, 2003).

Le domaine de liaison à l'ADN, compris entre les résidus 94 et 312, est un domaine hautement conservé parmi les membres de la famille p53 (Joerger *et al.*, 2009). Ce domaine est capable de reconnaître les éléments de reconnaissance (ER) situés en amont des gènes cibles de p53. Le consensus ER consiste en deux paires de pentamères en tête à tête, 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3', séparées par 0 à 13 nucléotides (Pu pour purine, Py pour pyrimidine) (Hoh *et al.*, 2002). Sur base de modèles de cristallographie, chaque pentamère du ER est associé à un DBD de p53 assemblé en tétramère (Cho *et al.*, 1994). Le domaine DBD n'est cependant pas le seul à lier l'ADN : le domaine C-terminal en est également capable, mais sans spécificité vis-à-vis des ER. C'est le domaine DBD qui est le plus touché par les mutations, dans le cancer (Laptenko and Prives, 2006). Ce domaine contient également la première des trois séquences d'adressage nucléaire, NLSI (313-322) (Stommel *et al.*, 1999).

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

Le domaine de tétramérisation, comprenant les résidus 324 à 355, recèle un signal d'exportation nucléaire NES (340-351) (Stommel *et al.*, 1999). Ce signal est masqué lorsque la protéine est sous forme de tétramère. En effet, ce domaine est aussi impliqué dans la tétramérisation de p53. Chaque monomère possède à ce niveau un brin β et une hélice α qui s'associent avec un autre monomère, à travers un feuillet β et une interface hélice-hélice antiparallèles, pour former un dimère. Deux de ces dimères peuvent ensuite s'associer grâce à une seconde interface différente hélice-hélice parallèle pour former le tétramère (Jeffrey *et al.*, 1995).

Enfin, le domaine C-terminal est un domaine non structuré, riche en résidus sérine et lysine. Ce domaine est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'ubiquitination et l'acétylation. Ces modifications entraînent des conséquences quant à la régulation de l'activité du suppresseur de tumeur ainsi que sa stabilité (Laptenko and Prives, 2006). C'est au niveau de ce domaine que résident les deux dernières séquences d'adressage nucléaire, NLS II (366-369) et NLS III (375-380) (Stommel *et al.*, 1999).

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle central dans la régulation de l'apoptose, du cycle cellulaire et de la sénescence répliquative. Son activité dépend de mécanismes à la fois dépendants et indépendants de la transcription (Fridman and Lowe, 2003). Le réseau régulé par p53, normalement en veille, est activé lorsque la cellule subit certains stress comme l'activation d'oncogènes ou la présence de dommages à l'ADN (Bourdon *et al.*, 2003). Afin que cette protéine puisse induire une réponse biologique mesurable suite à un signal de stress, son niveau doit atteindre un certain seuil et son activité spécifique doit augmenter (Braithwaite and Prives, 2006). Une fois activée, la protéine p53 peut stopper le cycle cellulaire et, dans certains cas, enclencher l'apoptose (Bourdon *et al.*, 2003).

Les mécanismes par lesquels p53 accomplit ces fonctions biologiques ne sont toujours pas complètement élucidés à ce jour. Cependant, il a été montré que p53 peut, en tant que facteur de transcription et sous forme de tétramère, moduler l'expression de gènes nécessaires à ses activités de gardien du génome et suppresseur

de tumeur (Laptenko and Prives, 2006). En effet, il a été démontré que les souris p53 KO sont moins sensibles aux radiations et chimiothérapies, tandis que le développement de tumeurs est accéléré (Meijerink *et al.*, 1998).

Régulateur positif des voies à la fois extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose, p53 active la transcription de gènes qui encodent des effecteurs apoptotiques et réprime celle des gènes anti-apoptotiques. Parmi les gènes pro-apoptotiques, les plus connus sont ceux qui codent pour les protéines Puma, Noxa, Bid, Bax,... (Miyashita and Reed, 1995; Robbins and Zhao, 2012). En ce qui concerne les gènes pro-survie, citons ceux codant pour les protéines Bcl-2, Bcl-xl ainsi que la Survivine (Hoffman *et al.*, 2002; Robbins and Zhao, 2012).

Les gènes apoptotiques induits par p53 participent à de nombreuses voies de mort : la voie des récepteurs de mort cellulaire (CD95/Fas, TNF, TRAIL, PIDD, etc.) ; la voie mitochondriale (Bax, Noxa, Puma, Bid, etc.) ; et la voie du réticulum endoplasmique (Bourdon *et al.*, 2003). Rappelons que le réticulum endoplasmique constitue la plus grande réserve de calcium de la cellule. Or, les membres de la famille Bcl-2, dont la régulation dépend entre autres de p53, sont impliqués dans le maintien homéostatique de la concentration en calcium dans le réticulum endoplasmique. De plus, l'efflux d'ions calcium agit souvent comme une boucle d'amplification de libération de cytochrome c. En effet, le cytochrome c libéré lie le récepteur InsP₃ au niveau du réticulum endoplasmique, entraînant une libération plus importante de calcium. Cette nouvelle libération de calcium entraîne alors une libération massive de cytochrome c depuis la mitochondrie, boucle de régulation positive qui aboutit à l'activation des caspases (Jin and El-Deiry, 2005). Ces voies apoptotiques ne sont donc pas totalement indépendantes et une interaction complexe a lieu entre elles (Bourdon *et al.*, 2003).

L'activation de p53 peut induire soit l'arrêt du cycle cellulaire soit l'apoptose. Qu'est-ce qui détermine si la cellule doit cesser de proliférer ou bien mourir ? Le choix de vie ou de mort pourrait être modulé par certains gènes préférentiellement transactivés par p53 (Bourdon *et al.*, 2003). La régulation transcriptionnelle comprend le fait que p53 doit « décider » quels gènes seront activés ou réprimés (Braithwaite and Prives, 2006). Différents niveaux de p53 au sein de

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

la cellule ainsi que les différences d'affinité de p53 pour ses promoteurs cibles peuvent faire pencher la balance vers l'une ou l'autre issue. Suivant le type cellulaire, les signaux cellulaires vont varier et les cofacteurs exprimés peuvent entraîner différentes réponses. En aval de p53, la surexpression de gènes anti-apoptotiques peut aussi influencer le destin cellulaire. Les modifications post-traductionnelles de p53 (phosphorylation, acétylation, sumoylation, etc.) peuvent également modifier la réponse transcriptionnelle orchestrée par p53, entraînant dès lors le choix d'une voie en particulier (Bourdon *et al.*, 2003).

En l'absence de stress, p53 a un temps de demi-vie de 9 minutes à température corporelle (Brown *et al.*, 2009). *Mdm2*, un des gènes cibles de p53, code pour une E3 ubiquitine ligase qui lie p53, promeut son ubiquitination et sa dégradation par le complexe du protéasome (Bourdon *et al.*, 2003). MDM2 inhibe aussi la fonction de p53 en modulant son activité transcriptionnelle et en prévenant son interaction avec la machinerie de transcription. L'interaction entre MDM2 et p53 se fait au niveau du TAD1 de p53. En effet, une hélice α de p53 s'insère dans une fente au sein de la protéine MDM2 grâce à des interactions hydrophobes (Kussie *et al.*, 1996). Une boucle d'autorégulation permet à p53 d'activer la transcription du gène *Mdm2*. Une expression élevée de MDM2 entraîne une diminution du niveau de p53, ce qui en retour mène à une diminution de l'expression de MDM2. MDM4 est un homologue structurel de MDM2 qui peut former un hétérocomplexe avec MDM2 et potentialiser l'ubiquitination de p53. ARF (Alternate Reading Frame), suppresseur de tumeur qui interagit avec MDM2, inhibe la dégradation de p53 et permet sa stabilisation (Erster *et al.*, 2004).

Outre ses fonctions de suppresseur de tumeur, p53 assure aussi un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, p53 régule la glycolyse et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) par la régulation transcriptionnelle du gène en aval TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) et par la synthèse de cytochrome c oxydase 2 (SCO2) (**Figure 2**). Le suppresseur de tumeur régule négativement la glycolyse en activant TIGAR, inhibiteur de la fructose-2,6-bisphosphate. En revanche, p53 régule positivement OXPHOS grâce à la régulation positive de SCO2, membre de la chaîne de transport d'électrons au niveau de la

membrane mitochondriale interne. La régulation de TIGAR et SCO2 par p53 est probablement séquentielle suivant les besoins cellulaires (Madan *et al.*, 2011).

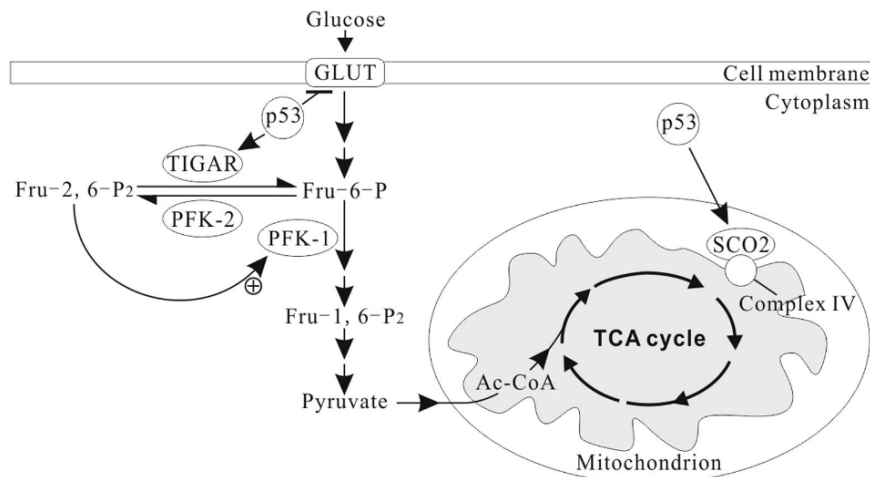


Figure 2 : p53 module le métabolisme énergétique cellulaire.

p53 réprime l'expression des gènes des transporteurs de glucose (comme *GLUT1* et *GLUT4*) et augmente les niveaux de TIGAR, inhibiteur de la glycolyse. De plus, p53 augmente le niveau de SCO2 dans la membrane mitochondriale interne, favorisant ainsi la respiration mitochondriale. TIGAR, TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator; SCO2, synthesis of cytochrome c oxidase 2 (Zheng, 2012).

1.1. Cancer et p53

Le cancer est une maladie essentiellement génétique (Vogelstein and Kinzler, 2004). Le développement de tumeurs est possible grâce à un processus de sélection Darwinien. En effet, une succession de mutations, chacune conférant l'un ou l'autre avantage de croissance, mène à la conversion progressive de cellules normales humaines en cellules cancéreuses. Les tumeurs humaines partagent ainsi un certain nombre d'altérations dans la physiologie de la cellule qui, collectivement, coordonnent une croissance maligne. Ces altérations comprennent : une autosuffisance en signaux de croissance, une insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, une résistance

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

aux stimuli apoptotiques, un potentiel réplcatif illimité, le maintien de l'angiogénèse, l'invasion tissulaire et la capacité de former des métastases (Hanahan and Weinberg, 2000; Schmitt *et al.*, 2000). Les tumeurs deviennent résistantes à l'apoptose en favorisant l'expression et/ou l'activation de protéines anti-apoptotiques, tout en réprimant l'expression et/ou l'activation des protéines pro-apoptotiques. Cette répression peut aussi se faire par délétion ou mutation des gènes codant pour ces protéines. Ce sont à la fois les voies intrinsèque et extrinsèque qui peuvent être affectées. Ces dérégulations comprennent les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, les IAPs (protéines inhibitrices de l'apoptose) ainsi que les voies PI-3K-AKT et NF-kB (Jin and El-Deiry, 2005).

Dans la quasi-totalité des cancers humains, la voie de p53 est altérée (Vogelstein *et al.*, 2000). Une moitié d'entre eux comprennent des mutations dans le gène *TP53*. L'autre moitié maintient le gène *TP53* sauvage mais acquiert des altérations génétiques ou épigénétiques qui compromettent la réponse dépendante de p53. Dans 95% des mutants p53, c'est le site de liaison à l'ADN qui est altéré. Ces mutations sont classées en deux catégories selon leur effet sur la stabilité thermodynamique de la protéine p53. La première catégorie inclut les mutations de résidus directement impliqués dans le contact à l'ADN (**Figure 3**). La seconde catégorie regroupe les mutations qui provoquent des distorsions locales ou globales de la conformation de la protéine (Brosh and Rotter, 2009). Une hétéro-oligomérisation de la protéine mutante avec la protéine sauvage entraîne une inhibition de l'activité de p53, réduisant son activité transcriptionnelle (Brown *et al.*, 2009). Beaucoup de mutants de p53 perdent leur fonction de suppresseur de tumeurs et acquièrent une activité dominant-négative. Ils peuvent aussi montrer une activité oncogénique qui est indépendante de p53 sauvage. Les mutations de p53 sont souvent associées à une résistance aux thérapies dans beaucoup de lignées cellulaires malignes. Ce phénomène est partiellement attribué à l'activité transcriptionnelle de p53 sur le gène *MDR1* (multi-drug resistance 1) et à son interférence avec l'apoptose (Brosh and Rotter, 2009).

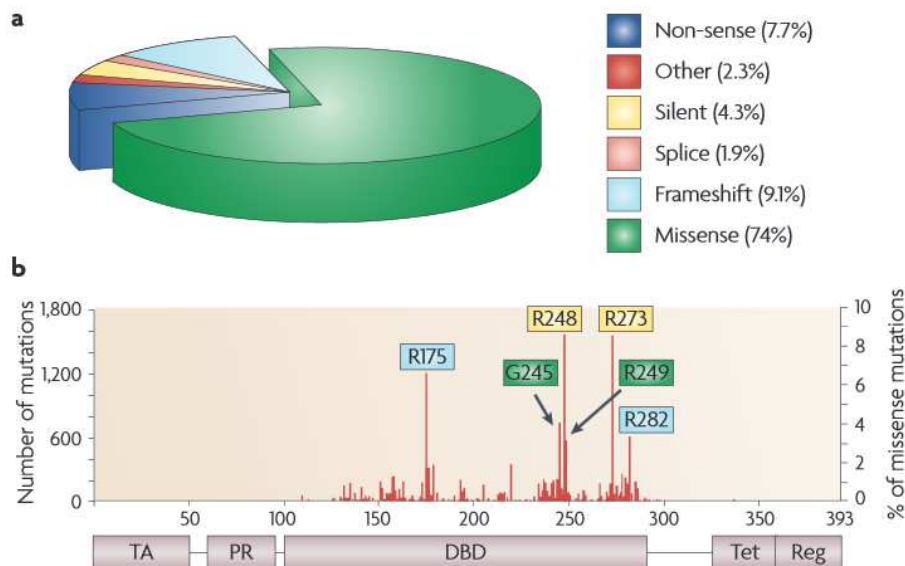


Figure 3: Distribution des mutations du gène TP53.

a) Diagramme circulaire représentant les différentes mutations dérivées de tumeurs, figurant dans la base de données IARC TP53 Mutation.

b) Distribution des mutations faux-sens rapportées le long de la séquence de p53 (393 acides aminés). Les six mutations les plus courantes sont surlignées en jaune pour les mutations de contact à l'ADN, vert pour les mutants avec des distortions locales et bleu pour les mutants globalement dénaturés. Les domaines qui composent p53 sont alignés en dessous. TA, domaine de transactivation ; PR, domaine riche en proline ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; Tet, domaine de tetramérisation ; Reg, domaine de régulation C-terminal. Ces données sont issues de la base de données IARC TP53 Mutation Database version R13 (Novembre 2008). (Brosh and Rotter, 2009).

Dans le cas des tumeurs où *TP53* n'est pas muté, la voie de p53 est altérée. La dérégulation des voies en amont et en aval de p53 facilitent la tumorigenèse (Efeyan and Serrano, 2007; Jin and El-Deiry, 2005). Parmi ces dérégulations, on retrouve l'altération des régulateurs tels qu'ATM (ataxia telangiectasia mutated), MDM2, ou ARF. Les mécanismes impliqués comprennent une augmentation de l'expression de MDM2 et MDM4, ainsi qu'une délétion ou une inactivation épigénétique d'ARF (Brown *et al.*, 2009). La voie de p53 peut aussi être entravée par la séquestration du suppresseur de tumeur dans un compartiment cellulaire donné. En effet, la protéine PARC (Parkin-like ubiquitine ligase) est capable de séquestrer la protéine

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

p53 dans le cytosol, inhibant ainsi l'apoptose dépendante de p53 (Nikolaev *et al.*, 2003). Enfin, des protéines virales peuvent aussi conduire à l'inactivation de p53 sauvage. Ainsi la protéine E6, produite par le virus HPV (Human Papillomavirus), peut lier p53 et induire la dégradation du suppresseur de tumeur par le protéasome (Thomas *et al.*, 1999). La protéine SV40-Tag (SV40 large T antigen), issue du virus simien 40, peut aussi lier et inactiver p53 (Lane and Crawford, 1979).

La résistance à l'apoptose des cellules tumorales est un frein à la thérapie anti-cancéreuse (Hanahan and Weinberg, 2000). Heureusement, des voies multiples avec une certaine redondance au sein d'une cellule, impliquent le développement possible de nouvelles thérapies. En effet, il est probable que les cellules cancéreuses qui ont perdu un composant pro-apoptotique possèdent encore d'autres composants similaires en attente d'activation (Jin and El-Deiry, 2005). De nombreuses stratégies apparaissent comme prometteuses en choisissant la voie de p53 comme cible dans le cadre d'interventions thérapeutiques contre le cancer. Ainsi, on vise l'« activation » de p53 dans le cas de tumeurs qui ont conservé le gène *TP53* sauvage, la « réactivation » de mutants de la protéine p53 en induisant des changements de conformation, et la construction d'agents qui ciblent les voies défectueuses dépendantes de p53 (Braithwaite and Prives, 2006). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la réactivation de p53 peut entraîner l'élimination de tumeurs (Ventura *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2007; Yonish-Rouach *et al.*, 1991). En effet, la restauration de l'expression de p53 sauvage dans une lignée leucémique murine dépourvue de p53 entraîne l'apoptose cellulaire *in vitro* (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). En contrôlant l'expression de p53 *in vivo* au moyen de la stratégie Cre-loxP, l'équipe de Ventura a montré que la réactivation de p53 entraîne la régression de lymphomes et sarcomes chez la souris (Ventura *et al.*, 2007).

De nombreux efforts ont été fournis pour restaurer l'apoptose des cellules cancéreuses munies de p53 muté, notamment en utilisant des molécules visant à restaurer la fonction normale de ces mutants (Fadeel and Orrenius, 2005). Par exemple, la molécule APR-246 sous sa forme active lie de façon covalente les cystéines de p53 mutant et sauvage. Cette interaction entraîne la réactivation des mutants et le repliement correct de la protéine sauvage (Bykov and Wiman, 2014).

D'autre part, dans le cas de cancers où p53 sauvage est maintenu dans la cellule tumorale, d'autres traitements visent à activer ce suppresseur de tumeur, par exemple en contrecarrant son principal inhibiteur (Drakos *et al.*, 2011). En effet, MDM2 est génétiquement amplifié dans de nombreuses tumeurs humaines. Dans ces systèmes, une faible diminution de l'expression de MDM2 permet de restaurer l'activité de p53 (Brown *et al.*, 2009). Les premières petites molécules antagonistes de MDM2 découvertes avec une activité *in vivo* ont été les nutlines. Celles-ci lient MDM2 sur le site de liaison de p53 (Vassilev *et al.*, 2004). Les nutlines peuvent entrer dans de nombreux types cellulaires en culture et inhibent l'interaction avec une haute spécificité, menant à la stabilisation de p53 et à son activation. La nutline-3a affecte différemment les cellules saines et les cellules cancéreuses. Chez les cellules saines, elle provoque l'induction d'effets biologiques réversibles tels que l'arrêt du cycle cellulaire aux phases G1 et G2. Dans le cas de cellules malignes pourvues de p53 sauvage, la nutline-3a provoque l'induction de l'apoptose (Brown *et al.*, 2009; Drakos *et al.*, 2011).

Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) et la caspase 9 étant des effecteurs en aval de p53 lors de l'apoptose, leur perturbation en situation d'apoptose intrinsèque facilite la transformation oncogénique et le développement de tumeurs chez la souris (Soengas *et al.*, 2001). Une régulation négative ou une séquestration d'Apaf-1 sont des stratégies courantes de la résistance apoptotique dans diverses formes de cancers humains (Fadeel and Orrenius, 2005). La *survivine* représente l'un des gènes les plus spécifiques du cancer dans le génome humain. En effet, son expression est indétectable dans les tissus différenciés adultes mais abondante dans différents types de cancers humains. Son inactivation thérapeutique rend les cellules cancéreuses plus vulnérables aux traitements anti-cancéreux et restaure l'apoptose (Zaffaroni *et al.*, 2005).

La recherche de nouvelles stratégies pour lutter contre le cancer se penche sur la combinaison de molécules thérapeutiques. Ainsi, il est possible de réactiver p53 sauvage au sein d'une cellule cancéreuse en utilisant conjointement de faibles doses de nutlines, de doxorubicine et de roscovitine. Ensemble, ces molécules ont montré un effet de synergie conduisant à une apoptose des cellules tumorales humaines qui expriment p53 sauvage. En ce qui concerne les patients

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

atteints de cancers pourvus de mutants p53, l'idée la plus attrayante serait de les traiter avec une « cyclothérapie ». Selon ce concept, la première phase consiste à placer l'ensemble des cellules saines du patient en arrêt du cycle, en activant p53 sauvage grâce à un agent non-génotoxique. Les cellules tumorales dépourvues du suppresseur de tumeur sauvage, non affectées, vont donc continuer à proliférer. La phase suivante de cette cyclothérapie serait alors de traiter le patient avec un inhibiteur mitotique qui ciblerait spécifiquement les cellules tumorales en prolifération. En arrêtant le cycle cellulaire des cellules saines, p53 agirait comme un chémoprotecteur des tissus face à l'inhibiteur mitotique et seules les cellules cancéreuses seraient affectées. La cyclothérapie permettrait ainsi d'éviter les effets secondaires néfastes des molécules anti-mitotiques tout en optimisant la suppression des cellules cancéreuses (Brown *et al.*, 2009).

1.2. Les voies d'activation de p53 suite aux dommages de l'ADN

L'activation de p53 est régulée par des mécanismes différents en fonction du stress (lésion de l'ADN, hypoxie, signaux oncogéniques,...). La protéine p53 dans sa forme inactive se trouve en faible concentration dans le cytoplasme. Cela est dû à MDM2, dont l'inhibition est modulée par des modifications covalentes des deux protéines (MDM2 et p53) et par d'autres protéines régulatrices. Par exemple, l'activation de p53 par des signaux oncogéniques chez la souris dépend principalement de l'induction de p19ARF (correspondant à p14 chez l'homme). En effet, p19ARF réduit la capacité d'interaction entre p53 et MDM2, ce qui permet la stabilisation de p53 (Fuster *et al.*, 2007).

Le réseau activé en cas de dommages à l'ADN est complexe. Il comprend une multitude de protéines qui détectent le dommage, qui transmettent le signal au sein de la cellule, et qui exécutent les réponses cellulaires (**Figure 4**). En réponse aux cassures double brins de l'ADN (CDB), la kinase ATM est activée. Celle-ci va activer de multiples protéines effectrices, telles que p53, MDM2 et CHK2 (Checkpoint Kinase 2). La phosphorylation de la sérine 15 de p53 par ATM permet sa stabilisation. Une fois stabilisé, p53 stimule la

transcription du gène *CDKN1A* (Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1A), qui code pour la protéine p21/WAF1/CIP1 (p21 par la suite). La protéine p21 est un puissant inhibiteur direct des complexes cycline-CDK2 (Cyclin-Dependent Kinase 2), -CDK1 et -CDK4/6, empêchant ainsi la progression du cycle cellulaire depuis la phase G1 vers la phase S (Gartel and Radhakrishnan, 2005; Kastan and Lim, 2000; Schmitt *et al.*, 2007; Shiloh, 2001). Les protéines qui sont recrutées au CDB sont les complexes protéiques comprenant NBS1/Mre11/Rad50 (Kastan and Lim, 2000; Schmitt *et al.*, 2007). On pense que lorsqu'il y a peu de CDBs, une petite fraction de p53 suffit à stimuler la transcription du gène codant pour p21. Lorsqu'il y a beaucoup de CDBs, p53 s'accumule au-delà d'une certaine limite, ce qui active des gènes pro-apoptotiques tels que ceux codant pour Bax, Puma et le récepteur FAS (Roos and Kaina, 2006).

Moins bien caractérisée, la kinase ATR est activée lorsqu'il y a des défauts dans la fourche de réplication de l'ADN ou des dommages simple brin de l'ADN. Son activation entraîne celle des protéines effectrices telles que p53 et CHK1. L'activation des protéines effectrices en général peut entraîner l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou l'activation de l'apoptose (Kastan and Lim, 2000; Schmitt *et al.*, 2007). Afin de prévenir l'entrée de la cellule en phase S, les kinases CHK1 et CHK2 ciblent la phosphatase régulatrice CDC25A. La phosphorylation multiple de CDC25A entraîne sa protéolyse via ubiquitination, ainsi que la phosphorylation et l'inhibition du complexe CDK2-cycline E qui normalement assure la transition de la phase G1 vers la phase S (Falck *et al.*, 2001).

ATM et ATR, ainsi que les kinases CHK1 et CHK2 peuvent donc cibler le suppresseur de tumeur. La phosphorylation et la stabilisation de p53 mène à l'accumulation de p21, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S (Shiloh, 2001). Alors qu'ATM est activée par des CDBs, ATR est principalement activée en réponse aux UVs et à des agents qui entraînent des blocages de la fourche de réplication de l'ADN. ATM et ATR exercent trois fonctions cruciales : la stimulation de la réparation des dommages à l'ADN, la régulation négative du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose via p53 (Roos and Kaina, 2006).

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

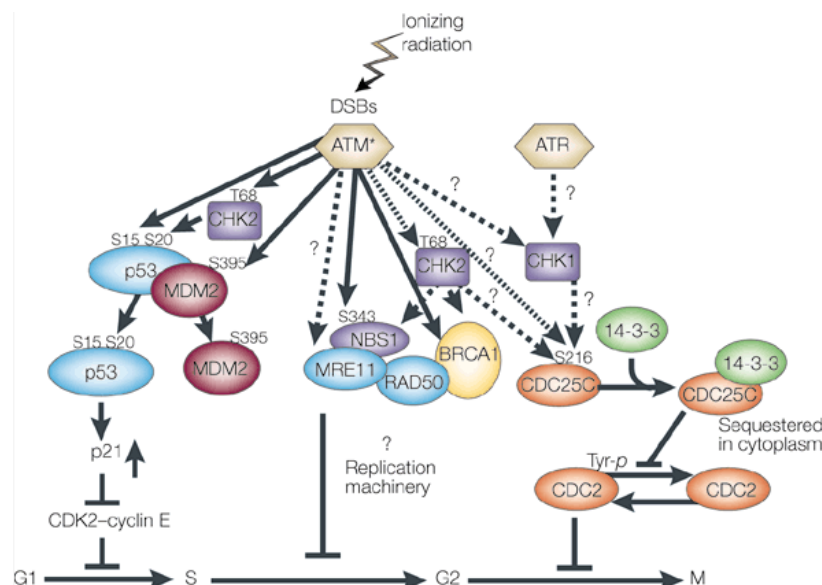


Figure 4: Activation d'ATM et ATR suite à un dommage à l'ADN.

L'activité spécifique d'ATM augmente en présence de cassures double brins (DSBs) suite à une radiation ionisante. G1 : ATM activé (ATM*) phosphoryle trois protéines impliquées dans le contrôle des fonctions ou des niveaux de p53 ; p53 (Serine 15), CHK2 (thréonine 68) et MDM2 (serine 395). Il semblerait qu'ATM active aussi la CHK2 kinase, permettant la phosphorylation de p53 en sérine 20. Cette phosphorylation ainsi que celle de MDM2 inhibent la liaison de MDM2 à p53, permettant une augmentation de p53 dans la cellule. Cette augmentation induit la transcription de p21, qui inhibe la CDK2-cycline E et entraîne l'arrêt du cycle en phase G1. S : ATM* phosphoryle NBS1, étape requise pour l'arrêt du cycle en phase S suite à une radiation ionisante. NBS1 fait partie d'un complexe avec les protéines MRE11, RAD50 et BRCA1, dont le rôle dans l'arrêt du cycle en phase S n'est pas encore clairement établi. CHK2 peut aussi être impliqué dans cette voie suite à son activation par ATM, en assurant la phosphorylation de BRCA1 ou NBS1. G2 : Les cibles en aval d'ATM ne sont pas encore identifiées au point G2. CHK1 et CHK2 sont probablement des cibles d'ATR et ATM respectivement, en phase G2. CDC25C et 14-3-3 sont impliqués dans la régulation de la kinase CDC2 et la progression du cycle en phase G2. Les flèches en pointillés et les points d'interrogation représentent des étapes possibles de signalisation, tandis que les flèches pleines représentent les phosphorylations reportées (Kastan and Lim, 2000).

1.3. Translocation mitochondriale de p53

En conditions normales, p53 est maintenu à un niveau basal grâce à la poly-ubiquitination induite par MDM2, qui entraîne sa dégradation (Grossman *et al.*, 2003). Des études ont montré que la mono-ubiquitination de p53 favorise son exportation depuis le noyau vers le cytoplasme (Brooks and Gu, 2006). Une fois dans le cytoplasme, la grande majorité de p53 est poly-ubiquitinée et dirigée vers le protéasome afin d'y être dégradé. En l'absence de stress, un faible niveau de p53 reste présent dans les tissus normaux, localisé dans le cytoplasme ou le noyau. Quelques données suggèrent que p53 sauvage peut être localisé en association avec le cytosquelette. Son interaction avec les microtubules serait assurée par la protéine moteur dynéine, qui participerait également au transport de p53 à travers la cellule en conditions de stress, utilisant le réseau de microtubules comme une « autoroute » (Giannakakou *et al.*, 2000).

Lors de différents stress, p53 subit une translocation mitochondriale. Le suppresseur de tumeur p53 est dépourvu de séquence d'adressage mitochondrial et il n'y a pas encore de mécanisme de localisation mitochondriale clairement établi. Cependant, certaines pistes sont émises. Ainsi, il a été suggéré que la biosynthèse de cardiolipine pourrait faciliter le transfert de p53 à la mitochondrie (Li *et al.*, 2010). En cas d'hypoxie, le suppresseur de tumeur Tid1 favoriserait sa translocation mitochondriale (Ahn *et al.*, 2010). Ces deux mécanismes sont décrits ci-dessous.

La cardiolipine (1,3-bis (19,29-diacyl-39-phosphoryl-*sn*-glycerol)-*sn*-glycerol) est un phospholipide anionique, asymétrique et restreint à la mitochondrie. Il s'agit du composé phospholipidique majeur de la membrane interne et externe mitochondriale (8-15%). Sa biosynthèse est régulée par le CDS (CDP-diacylglycérol synthase) qui convertit l'acide phosphatidique en CDP-diacylglycérol. La PGS (phosphatidylglycerophosphate synthase) catalyse la formation de phosphatidylglycerolphosphate à partir de CDP-diacylglycérol et de glycerol-3-phosphate (Li *et al.*, 2010). Il a été démontré qu'il y a une interaction électrostatique entre le C-terminal de p53 d'une part, la cardiolipine, le phosphatidylglycérol et l'acide phosphatidique d'autre part *in vitro*. Cependant, l'interaction entre p53 et l'acide

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

phosphatidique est plus évidente, ce qui suggère que p53 pourrait être impliqué dans la voie de biosynthèse de la cardiolipine. La diminution de l'expression des protéines PGS et CDS entraîne une diminution de la translocation mitochondriale de p53. Ceci suggère que la cardiolipine et ses précurseurs pourraient avoir un rôle de transporteurs et faciliter ainsi le transfert de p53 vers la mitochondrie. L'interruption de la biosynthèse de cardiolipine ne diminue pas seulement le taux de translocation mitochondriale de p53 mais réduit aussi la translocation mitochondriale de Bcl-xl et Bcl-2. Comme il a été démontré que p53 lie Bcl-xl (Mihara *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005), il est suggéré que p53 agit comme un transporteur dans la localisation de Bcl-xl à la mitochondrie (Bivik *et al.*, 2006; Endo *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010).

Le suppresseur de tumeur Tid1 forme un complexe avec p53 en conditions d'hypoxie. Ce complexe permet la translocation de p53 à la mitochondrie et l'initiation subséquente de la voie apoptotique mitochondriale. La perte d'expression de Tid1 abroge la translocation mitochondriale de p53 et inhibe l'apoptose. Une surexpression de Tid1 promeut la relocalisation mitochondriale de p53 et l'apoptose. Ces résultats établissent Tid1 en tant que nouveau régulateur de l'apoptose dépendante de p53. Les thérapies visant à promouvoir la fonction de Tid1 favoriseraient donc la localisation mitochondriale de p53 et l'apoptose dans différents cancers (Ahn *et al.*, 2010).

Outre les transporteurs, des inhibiteurs de la translocation mitochondriale ont aussi été décrits. A titre d'exemples, l'obstruction des PTP par la cyclosporine A (qui fixe la cyclophiline D, composant des PTP) inhibe la translocation mitochondriale du suppresseur de tumeur (Liu *et al.*, 2008). La pifithrin-μ, en diminuant l'affinité de p53 pour les membres de la famille Bcl-2, empêche également la relocalisation de p53 à la mitochondrie (Strom *et al.*, 2006). De plus, il semble que la protéine Bak assure aussi un rôle dans la mesure où p53 est incapable de transloquer à la mitochondrie dans les cellules *Bak*^(-/-) (Leu *et al.*, 2004).

Les modifications post-traductionnelles de p53 jouent aussi un rôle dans sa localisation subcellulaire. En effet, la monoubiquitination de p53 est nécessaire à son exportation nucléaire (Carter *et al.*, 2007) et pourrait même être impliquée dans le mécanisme de translocation mitochondriale (Marchenko and Moll, 2007). Des données indiquent que ni l'acétylation ni la phosphorylation sont impliquées dans la localisation mitochondriale de p53 (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004; Nemajerova *et al.*, 2005). La nitration des tyrosines de p53 empêche sa translocation mitochondriale (Hernlund *et al.*, 2009). Il a été démontré que la phosphorylation de la sérine 15 favorise l'interaction de p53 avec Bcl-2 et Bcl-xl (Sykes *et al.*, 2009).

1.4. Modifications post-traductionnelles de p53

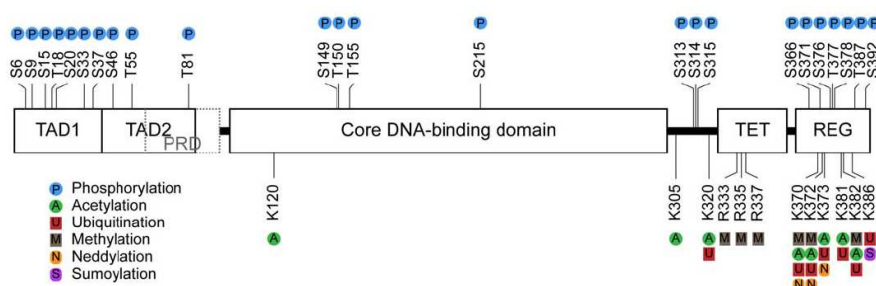


Figure 5: Sites de modification post-traductionnelles de p53.

La représentation schématique des 393 acides aminés de la protéine p53 humaine indique les sites de modification post-traductionnelles. Parmi celles-ci, la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la méthylation, la neddylation et la sumoylation. Abréviations : domaine de transactivation N-terminal (TAD), domaine riche en proline (PRD), domaine de tétramérisation (TET), domaine de régulation C-terminal (REG), arginine (R), lysine (K), sérine (S), thréonine (T) (Maclaine and Hupp, 2009).

Les modifications post-traductionnelles sont des voies rapides, efficaces et réversibles de régulation de la stabilité, de la localisation, de la fonction et des interactions d'une protéine avec d'autres molécules. La stabilisation et l'activation de p53 dépendent d'une série de modifications post-traductionnelles : la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la neddylation, la glycosylation et la rybosylation (**Figure 5**). Ces

Chapitre 1 : Le suppresseur de tumeur p53

modifications jouent aussi un rôle de signal pour le trafic cellulaire de p53 entre les organelles. Comme p53 est une protéine principalement nucléaire, son exportation nucléaire et son abondance cytosolique déterminent sa capacité à interagir avec la mitochondrie.

L'ubiquitination de p53, assurée par la protéine MDM2, est cruciale pour son exportation nucléaire (Carter *et al.*, 2007). En effet, p53 est monoubiquitiné par MDM2 dans le noyau, au niveau de sa région C-terminale, dévoilant alors la séquence d'exportation nucléaire (NES) de p53. Le suppresseur de tumeur peut alors sortir vers le cytosol (Gottifredi and Prives, 2001). MDM2 ne catalyse que les monoubiquitinations de p53 (à un ou plusieurs sites) tandis que les polyubiquitinations de p53, qui l'adressent au protéasome, impliquent le cofacteur cytosolique CBP/p300 (Grossman *et al.*, 2003).

L'acétylation stabilise la protéine p53 et inhibe son ubiquitination par MDM2 puisque ces modifications ont lieu sur les mêmes sites. De plus, l'acétylation induit un changement de conformation de p53 qui empêche l'ubiquitination par MDM2 des résidus lysine non acétylés. Ces deux mécanismes confèrent à p53 acétylé un temps de demi-vie considérable, de plus de deux heures (Li *et al.*, 2002). L'acétylation stimule aussi l'activité transcriptionnelle de p53 et sa liaison à l'ADN, grâce au recrutement d'activateurs (Brooks and Gu, 2006). En cas d'hyperacétylation, p53 ne peut oligomériser : il s'accumule alors dans le cytoplasme suite à l'exposition du NES (Kawaguchi *et al.*, 2006). Ainsi, la localisation subcellulaire de p53 dépend de l'acétylation. Une étude indique que p53 est acétylé dans le noyau, et dé-acétylé dans le cytoplasme (Han *et al.*, 2008).

La sumoylation, impliquant la protéine SUMO (Small ubiquitin-related modifier), affecte la protéine d'intérêt en empêchant d'autres modifications telles que l'ubiquitination. Le résidu Lys386 de p53 est sujet à la sumoylation. Ceci entraîne une diminution de l'expression des gènes cibles du suppresseur de tumeur impliqués dans l'apoptose cellulaire (Schmidt and Muller, 2002). La sumoylation au niveau de la lysine 386 promeut l'exportation nucléaire de p53 (Carter *et al.*, 2007; Heo *et al.*, 2011).

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

2.1. Introduction à l'apoptose

Le terme « mort cellulaire programmée » est utilisé pour décrire la mort cellulaire qui survient à des moments et des endroits prédictibles. Cette dénomination implique que la mort est incluse au sein du développement et maintien de l'organisme (Fuchs and Steller, 2011). L'apoptose a été décrite pour la première fois en 1972 par Currie et son équipe (Kerr *et al.*, 1972). C'est la forme la plus courante de mort cellulaire programmée, processus où les cellules activent un programme de suicide intrinsèque. L'apoptose est une mort cellulaire finement régulée et mesurée dans le contexte physiologique. Elle comprend une série de changements morphologiques et biochimiques tels que : la dissociation des membranes, le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et du noyau, entraînant la formation de corps apoptotiques. Ceux-ci sont rapidement reconnus, ingérés et dégradés par des phagocytes ou des cellules voisines (Fadeel and Orrenius, 2005; Kroemer *et al.*, 2009). Ce type de mort cellulaire se différencie de l'autophagie et de la nécrose ou nécroptose (**Figure 6**).

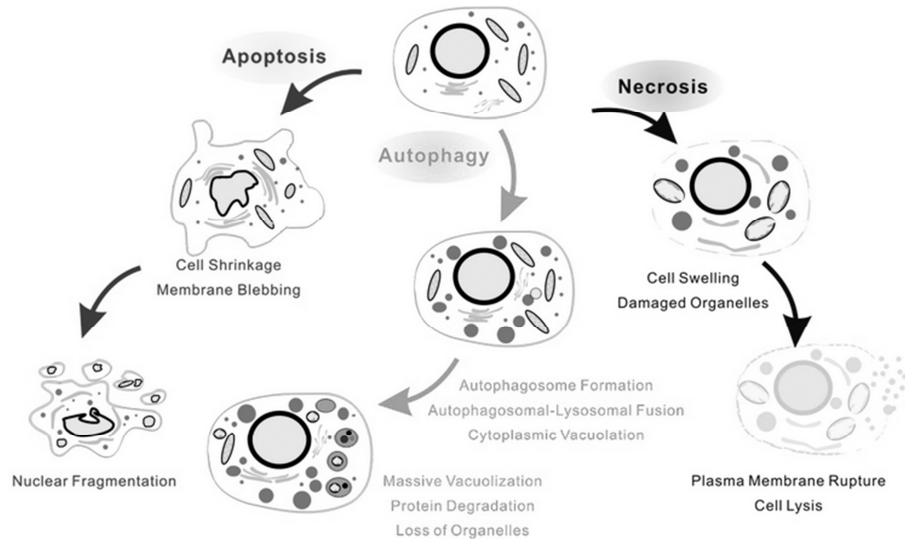


Figure 6 : L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui comprend la dissociation des membranes, le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et du noyau, entraînant la formation de corps apoptotiques. L'autophagie est caractérisée par une séquestration du matériel cytoplasmique au sein d'autophagosomes qui fusionnent ensuite avec des lysosomes. L'autophagie a lieu en absence de condensation de la chromatine et en présence d'une vacuolisation massive du cytoplasme. La nécrose est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organelles, une rupture de la membrane plasmique et la perte subséquente du contenu intracellulaire. (Tan *et al.*, 2014).

L'autophagie est caractérisée par une séquestration du matériel cytoplasmique au sein d'autophagosomes, afin d'être dégradés par les lysosomes. La fusion entre les autophagosomes et les lysosomes génère des autolysosomes où le contenu de l'autophagosome ainsi que sa membrane interne sont dégradés. La mort cellulaire par autophagie est morphologiquement définie comme ayant lieu en absence de condensation de la chromatine et en présence de nombreuses vacuolisations autophagiques dans le cytoplasme (Kroemer *et al.*, 2009).

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

La nécrose est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organelles, une rupture de la membrane plasmique et la perte subséquente du contenu intracellulaire. La nécrose est une mort cellulaire non programmée, accidentelle, qui survient suite à des conditions physiopathologiques telles que l'infection, l'inflammation ou l'ischémie (Blank and Shiloh, 2007). Il existe une mort cellulaire semblable à la nécrose, mais qui survient de façon régulée par des voies de transduction de signal ainsi que par des mécanismes cataboliques. Cette mort cellulaire programmée porte le nom de nécroptose (Kroemer *et al.*, 2009). Elle comprend une hyperactivation de PARP (poly(ADP-ribose)polymérase), suivie de l'épuisement de l'ATP cellulaire et l'activation de RIP (Receptor interacting protein). Ceci entraîne l'exécution de la nécroptose, caractérisée par une production de ROS (Reactive oxygen species), la peroxydation des lipides, le gonflement des organelles, la rupture de la membrane cellulaire et la libération du contenu intracellulaire (Vandenabeele *et al.*, 2010).

Dans chaque être humain, un million de cellules subissent l'apoptose par seconde, dans le cadre du renouvellement et de la régénération journalière des tissus (Reed, 2006). Il est donc crucial que l'équilibre entre la mort et la prolifération cellulaire soit finement régulé. En circonstances normales, les cellules endommagées ou inutiles à l'organisme entreprennent l'apoptose. Cependant, des défauts dans l'exécution de cette mort cellulaire programmée peuvent conduire à différentes pathologies comme les maladies auto-immunes et la tumorigenèse. Dans le cas de tumeurs humaines, certains gènes qui contrôlent l'apoptose sont mutés ou mal régulés (Blank and Shiloh, 2007). Comprendre le mécanisme de régulation de l'apoptose dans le cas du cancer est dès lors un sujet important pour le développement de nouvelles thérapies contre cette maladie.

2.2. Les deux voies apoptotiques

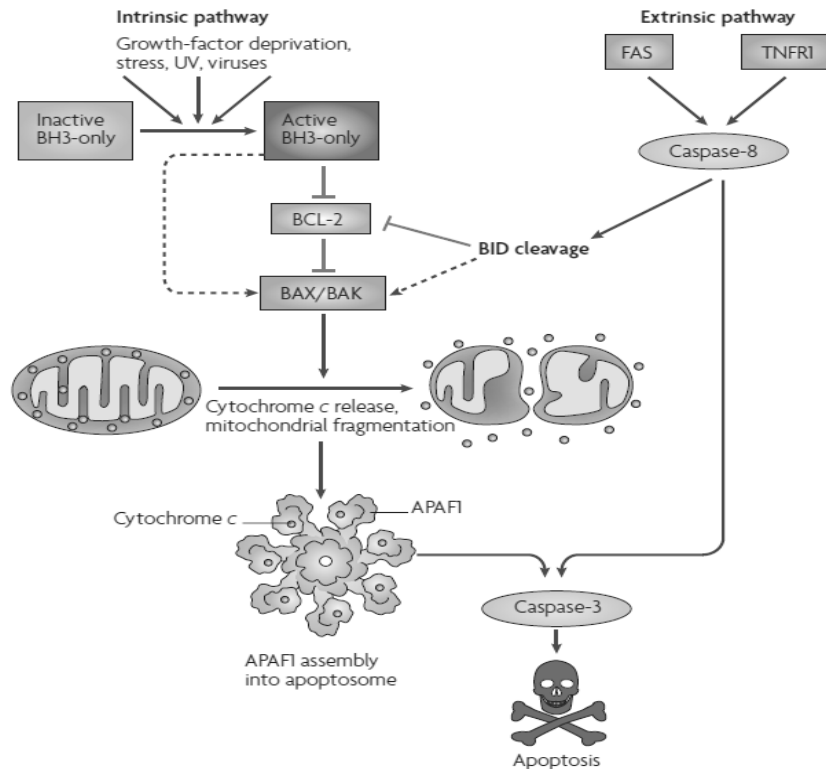


Figure 7: Voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

L'apoptose peut être induite grâce à des récepteurs cellulaires tels que Fas et TNFR1 (voie extrinsèque à droite) ou bien par des agents génotoxiques ou des stress métaboliques (voie intrinsèque à gauche). La voie intrinsèque débute avec l'induction ou l'activation post-traductionnelle des protéines BH3 only, ce qui entraîne l'activation des membres effecteurs Bax et Bak (ligne en pointillés) et l'inactivation de membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Ceci favorise l'oligomérisation de Bax et Bak et la formation de pores au sein de la MME, ce qui promeut la libération de cytochrome c ainsi que d'autres effecteurs de l'apoptose dans le cytosol. Le cytochrome c entraîne l'activation de APAF1 en apoptosome, ce qui permet d'activer les caspases et l'apoptose. La voie extrinsèque peut sauter l'étape mitochondriale. En effet, la caspase 8 initiatrice peut dans certains cas activer directement la caspase 3 effectrice. Dans d'autres cas, une amplification du signal apoptotique nécessite un relais par la mitochondrie. La caspase 8 clive la protéine BH3 Bid et sa forme tronquée, tBid, peut directement activer Bax et Bak (Youle and Strasser, 2008).

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

Deux voies principales permettent l'activation de l'apoptose chez les mammifères (**Figure 7**). La première, nommée voie extrinsèque, implique la liaison entre un ligand extracellulaire et un récepteur transmembranaire à la membrane plasmique. Cette liaison entraîne alors le recrutement de protéines cytosoliques, l'activation de caspases initiateuses et en conséquence l'activation des caspases effectrices en aval (Blank and Shiloh, 2007).

La seconde voie est la voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale, plaçant la mitochondrie au cœur de la cascade de signalisation. En effet, la mitochondrie n'est pas seulement un important producteur d'ATP, elle est aussi une « armoire à poisons » prête à libérer diverses protéines pro-apoptotiques dans le cytosol (Fadell and Orrenius, 2005). Cette voie intègre des signaux provenant d'une large variété de stress, tels que le dommage à l'ADN, les dommages au cytosquelette, la perte de l'adhésion, etc., qui convergent vers la mitochondrie. Ces stimuli apoptotiques entraînent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (PMME), permettant la libération des protéines qui se trouvent dans l'espace inter-membranaire (Blank and Shiloh, 2007). Le cytochrome c, composant essentiel de la chaîne de transfert d'électrons, est la plus connue parmi les protéines libérées. Une fois dans le cytosol, cette protéine interagit avec Apaf-1. Elle permet alors la liaison de dATP au site de fixation nucléotidique d'Apaf-1. Cette liaison induit un changement de conformation de la molécule qui peut oligomériser en apoptosome. L'apoptosome active ensuite la caspase 9, initiateuse de la cascade des caspases (Green and Kroemer, 2005) (**Figure 8**).

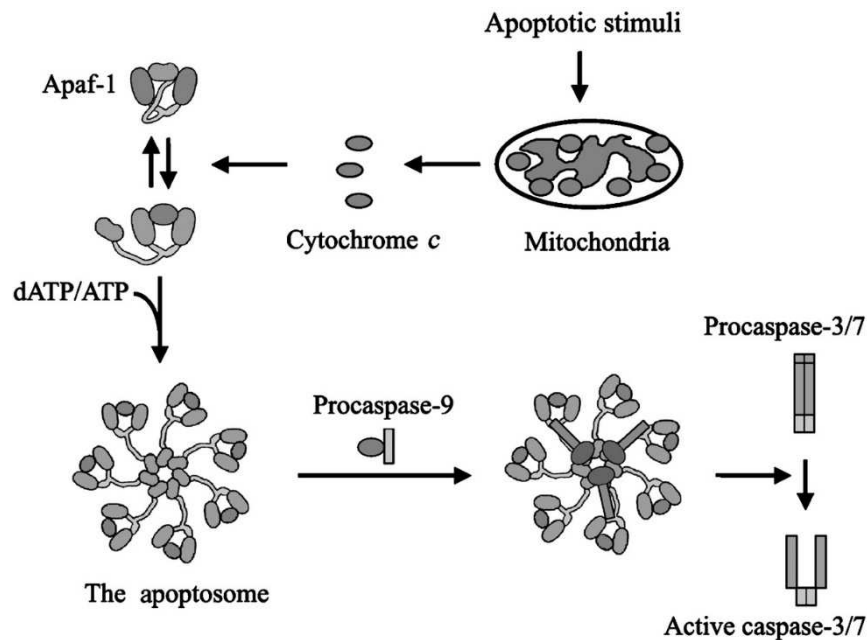


Figure 8: Formation de l'apoptosome et activation des caspases.

Suite à un stimulus apoptotique, le cytochrome c est libéré de l'espace inter-membranaire mitochondrial et interagit avec la protéine Apaf-1. Cette interaction entraîne un changement de configuration permettant la fixation de dATP, entraînant l'oligomérisation d'Apaf-1 en apoptosome. Celui-ci interagit alors avec la caspase 9, permettant l'activation en cascade de la caspase 9, 3 et 7 (Jiang and Wang, 2004).

2.3. La mitochondrie

La mitochondrie a été amenée au-devant de la scène apoptotique suite à certaines évidences. Premièrement, la découverte des protéines de la famille de Bcl-2 et de leurs rôles. Les membres anti-apoptotiques de cette famille sont situés dans l'enveloppe nucléaire, la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane mitochondriale externe. Ces membres sont capables de prévenir la mort cellulaire induite par de nombreux stimuli, dans différents types cellulaires. Deuxièmement, un grand nombre de changements dans la biogenèse et la fonction de la mitochondrie ont été observés associés à l'avènement de l'apoptose. Enfin, troisièmement, il a été démontré

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

que la translocation du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol est une étape cruciale dans l'activation de l'apoptose dans différents modèles de mort cellulaire (Estaquier *et al.*, 2012). La découverte décisive est l'inhibition de la libération de cytochrome c par une surexpression de Bcl-2, ce qui établit définitivement un rôle actif de la PMME dans l'apoptose (Yang *et al.*, 1997).

Il a aussi été observé que la mitochondrie pouvait libérer d'autres facteurs apoptotiques tels que Smac (second mitochondrial activator of caspases)/DIABLO (direct IAPs binding protein with low pH), Omi/HtrA2 (high temperature requirement factors), qui favorisent l'exécution apoptotique en inactivant les IAPs (Verhagen *et al.*, 2000). Les protéines IAPs sont des régulateurs négatifs des caspases. En effet, elles inhibent l'activité des caspases par interaction directe. Elles peuvent aussi agir comme des E3 ubiquitine-ligase et entraîner leur dégradation par le protéasome (Jin and El-Deiry, 2005). Une surexpression des IAPs peut donc contribuer à l'oncogenèse. SMAC/Diablo augmente l'activation des caspases en contrecarrant la fonction des IAPs par interaction directe. Omi/HtrA2 assure le même rôle et est en plus une sérine protéase qui clive et inactive des IAPs.

La mitochondrie libère aussi des protéines pro-apoptotiques qui n'ont pas d'action directe sur l'activation des caspases. Parmi ces protéines, il y a AIF (apoptosis inducing factor) et Endo G (endonucléase G). AIF est une flavoprotéine qui, suite à l'induction de l'apoptose, peut transloquer depuis la mitochondrie vers le noyau, où il dégrade l'ADN (Wang *et al.*, 2002). Endo G est une endonucléase qui entraîne la fragmentation de l'ADN de façon indépendante des caspases, dans les cellules de mammifères (Li *et al.*, 2001). La mitochondrie participe aux mécanismes de mort à la fois caspases-dépendantes (cytochrome c, SMAC/DIABLO, Omi/HtrA2) et caspases-indépendantes (Endo G, AIF) (Jiang and Wang, 2004).

2.4. La voie des caspases

Chez les mammifères, l'induction de l'apoptose entraîne dans la plupart des cas l'activation des caspases (Godefroy *et al.*, 2004). Les caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) appartiennent à une famille de 14 protéases qui sont exprimées sous la forme de proenzymes. Le clivage par protéolyse entraîne leur activation. En amont, les caspases initiateuses sont capables d'activation auto-catalytique. En aval, les caspases effectrices nécessitent l'intervention des caspases initiateuses pour être activées. Cette cascade protéolytique intracellulaire aboutit au démantèlement de la cellule et à la formation de corps apoptotiques (Fadell and Orrenius, 2005). Bien que la plupart des caspases participent à l'apoptose, certaines sont impliquées dans d'autres mécanismes, telles que la maturation des cytokines et le processus d'inflammation (Wang and Lenardo, 2000). Certaines protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xl et IAPs sont aussi clivées par les caspases. Cependant, on ne sait pas encore si ces clivages constituent un mécanisme de « feedback » positif ubiquitaire, ou bien un stimuli spécifique d'un type cellulaire ou d'un événement particulier (Jin and El-Deiry, 2005).

Ainsi, les substrats des caspases participent au processus apoptotique (**Figure 9**). L'actine et les protéines cytosquelettiques qui lient l'actine contribuent à la dissociation de la membrane cytoplasmique lorsqu'elles sont dégradées. Les lamines ainsi que l'appareillage permettant la mitose nucléaire NuMA (nuclear matrix protéin) sont responsables de la perte de l'intégrité nucléaire lorsqu'ils sont clivés. Les ACINUS (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus) sont ciblés par la caspase 3, entraînant la condensation de la chromatine, caractéristique de l'apoptose. La protéine ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) est clivée par la caspase-3 en CAD (caspase activated DNase). CAD va alors transloquer dans le noyau et induire la fragmentation de l'ADN tous les ~50 kb (taille correspondant aux boucles de chromatine) (Blank and Shiloh, 2007).

D'autres substrats intracellulaires des caspases jouent des rôles importants en réponse aux dommages à l'ADN, car leur clivage et désactivation entraîne irrévocablement la cellule vers l'apoptose. Parmi ces substrats, il y a ATM dont le rôle vis à vis des CDBs a déjà

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

été abordé dans cette introduction. La sous-unité catalytique de DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) participe aux réparations des CDBs en réalisant l'assemblage des extrémités non homologues (Burma and Chen, 2004). La recombinaise Rad51 et la protéine Rad9 participent aussi à la réparation des CDBs, via recombinaison homologue (Wyman and Kanaar, 2006). PARP-1, modifie de façon post-traductionnelle de nombreuses protéines, en synthétisant et liant des chaînes poly(ADP-ribose). PARP-1 permet entre autres la translocation nucléaire d'AIF depuis la mitochondrie, où elle induit la fragmentation de l'ADN, entraînant la condensation de la chromatine à la périphérie du noyau (Schreiber *et al.*, 2006).

Les caspases peuvent aussi cliver et inactiver des substrats nécessaires à la division et à la survie cellulaire, tels que la Survivine qui appartient à la famille des IAPs (Zaffaroni *et al.*, 2005). De même, les caspases peuvent aussi inactiver des antagonistes de la mort cellulaire telles que les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 (Kirsch *et al.*, 1999) et Bcl-xl (Clem *et al.*, 1998). Le clivage de Bcl-2 par les caspases le prive de son domaine BH4 en N-terminal, ce qui lui fait perdre sa capacité anti-apoptotique et le transforme en molécule pro-apoptotique (Cheng *et al.*, 1997). De plus, les caspases entraînent l'apoptose non seulement en inactivant les molécules anti-apoptotiques mais aussi en activant des régulateurs pro-apoptotiques tels que Bid (Wei *et al.*, 2000). Les événements qui précèdent l'induction de la PMME peuvent être contrecarrés par une panoplie de molécules intracellulaires inhibitrices de l'apoptose. En revanche, le clivage des substrats des caspases est un « point de non-retour » dans le déroulement du processus apoptotique (Blank and Shiloh, 2007).

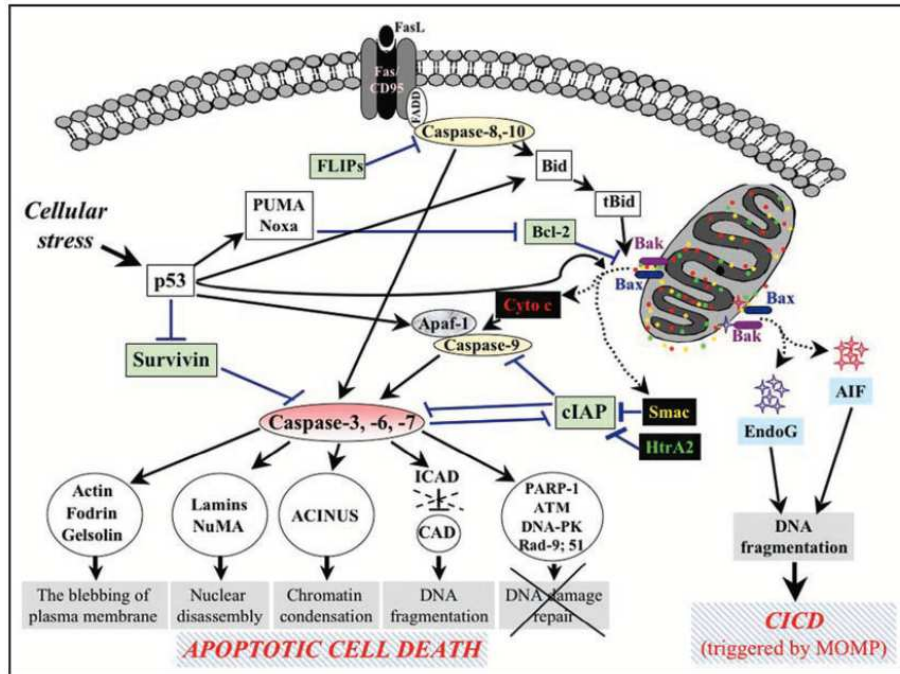


Figure 9: Mécanisme des voies apoptotiques.

Le dénominateur commun des voies extra et intrinsèques de mort cellulaire programmée est la PMME (MOMP dans la figure) et la libération des protéines de l'espace inter-membranaire. Les caspases initiatrices et effectrices apparaissent dans des ellipses jaunes et rouges respectivement. La mort cellulaire indépendante des caspases est notée CICD dans la figure. Les inhibiteurs de l'apoptose sont représentés dans des rectangles verts (Blank and Shiloh, 2007)

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

2.5. Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe

Il existe deux modèles majeurs, non exclusifs, qui expliquent comment les membres de la famille de Bcl-2 contrôlent le PMME.

Le premier modèle implique la régulation de l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore). Le PTP est un canal macromoléculaire qui relie les membranes mitochondriales interne et externe. Les composants principaux du PTP sont les protéines ANT (adenine nucleotide translocator), VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1), le récepteur périphérique aux benzodiazépines, la cyclophiline D ainsi que l'hexokinase et la créatine kinase, qui créent ensemble un grand pore perméable aux solutés de moins de 1,5 kDa. La cyclophiline D, située dans la matrice mitochondriale, facilite le PTP, probablement en entraînant des changements de configuration des protéines de la membrane interne (Green and Kroemer, 2005). L'ouverture du PTP entraîne une dépolarisation mitochondriale, la dissipation du potentiel transmembranaire, un découplage de la phosphorylation oxydative et une augmentation du volume dans la matrice mitochondriale. Ceci entraîne alors une rupture de la membrane mitochondriale externe avec la libération aspécifique de toutes les protéines contenues dans l'espace inter-membranaire (cytochrome c, AIF, DIABLO/Smac, Omni/Htra2).

Le second modèle repose sur la formation de canaux dans la membrane mitochondriale externe, formés par Bax et Bak, deux membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Dans ce modèle, la fonction mitochondriale n'est pas altérée dans la mesure où le potentiel de membrane et la production d'ATP sont maintenus. La fonction de Bax et Bak semble être régulée par les lipides et protéines mitochondriaux tels que la cardiolipine et VDAC2. L'oligomérisation de Bax et Bak est fortement régulée par d'autres membres de la famille de Bcl-2 (Jiang and Wang, 2004). La formation de ces canaux permet la libération de protéines depuis l'espace inter-membranaire vers le cytosol. Dans ce modèle, les autres membres de la famille de Bcl-2 peuvent soit activer soit inhiber la formation de ces canaux (Jourdain and Martinou, 2009) (**Figure 10**).

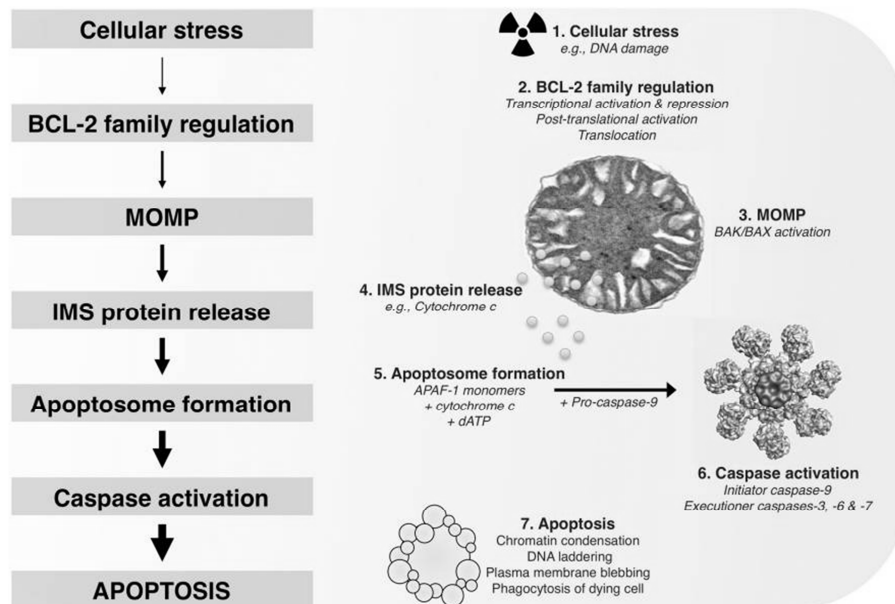


Figure 10: Voie mitochondriale de l'apoptose.

Suite à un stress tel que le dommage à l'ADN, les protéines de la famille Bcl-2 sont régulés par des mécanismes transcriptionnels (davantage ou moins transcrits) et post-traductionnels (phosphorylation, clivage, relocalisation). Si la cellule est irréparable, les signaux pro-apoptotiques vont conduire à la PMME (MOMP dans l'image), permettant la libération de protéines solubles intra-membranaires tels que le cytochrome c. APAF-1, cytochrome c et dATP vont ensuite former l'apoptosome avec la pro-caspase 9, permettant ainsi son activation. Ceci est le point de départ de la cascade d'activation des caspases. Ces caspases entraînent les phénotypes apoptotiques tels que la condensation de la chromatine, le clivage de l'ADN et le démantèlement des membranes. (Anvekar *et al.*, 2011)

Les mitochondries ont été considérées comme des acteurs passifs de l'apoptose avant l'activation des PTP. Cependant, ces dernières années ont apporté des évidences indiquant que cette organelle pouvait jouer un rôle actif dans la perméabilisation par Bax et Bak. Plusieurs groupes de recherche clament l'existence de protéines mitochondriales impliquées dans l'ancrage et/ou l'insertion de Bax et Bak dans la mitochondrie (Petit *et al.*, 2009). A titre d'exemple, Cheng et son équipe ont montré que Bak complexe avec une isoforme de VDAC (VDAC2) dans les cellules saines et que cette

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

association maintient Bak inactif. Ceci permettrait de faire le lien entre le PTP et les membres de la famille Bcl-2 (Cheng *et al.*, 2003).

Le suppresseur de tumeur p53 joue aussi un rôle direct dans la régulation de la PMME. Une fois à la mitochondrie, p53 interagit avec les membres pro et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003; Sot *et al.*, 2007). De nombreux mécanismes ont été considérés et seront détaillés au chapitre 3 de cette introduction.

La PMME est considérée comme un « point de non-retour » puisqu'elle entraîne la cascade apoptotique. En effet, lorsque la PMME a lieu, la machinerie cytosolique répond en activant les caspases. En cas d'inhibition des caspases, une voie de mort cellulaire indépendante des caspases peut-être enclenchée. Cette voie peut impliquer les protéines AIF (Apoptosis Inducing Factor) et Endo G (Endonucléase G) (Blank and Shiloh, 2007). Une fois dans le cytosol, AIF va transloquer dans le noyau et entraîner la condensation de la chromatine ainsi que la fragmentation de l'ADN (Hangen *et al.*, 2010). D'autre part, Endo G est aussi une nucléase qui transloque dans le noyau une fois libéré de l'espace intermembranaire mitochondrial, clivant la chromatine en fragments nucléosomaux (Li *et al.*, 2001).

2.6. Fonctions de p53 à la mitochondrie

Depuis plus de 10 ans, de nombreux articles décrivent les activités proapoptotiques de p53. En particulier, les activités apoptotiques indépendantes de son activité transcriptionnelle, ainsi que sa capacité à réguler, à travers des interactions protéiques, les membres de la famille de Bcl-2 (Caelles *et al.*, 1994; Chipuk *et al.*, 2004; Fridman and Lowe, 2003; Johnson *et al.*, 2008; Kakudo *et al.*, 2005).

Caelles et son équipe ont démontré les premiers la capacité de p53 à induire l'apoptose indépendante de la transcription. Ces chercheurs ont travaillé sur des cellules GHFT1 (cellules hypophysaires de souris) exprimant une forme inductible de p53 sensible à la température (mutant p53val135). Dans ces cellules,

l'induction de l'apoptose suite à un dommage à l'ADN est dépendante de p53. L'apoptose est proportionnelle à la période où la température à laquelle p53val135 devient actif est adoptée. De plus, dans ce cas-ci, l'apoptose a été indépendante de la synthèse d'ARN ou de nouvelles protéines (Caelles *et al.*, 1994). L'étude d'autres p53 mutants a aussi ouvert la voie vers l'hypothèse selon laquelle p53 peut entraîner l'apoptose sans recourir à son activité de facteur de transcription. Ainsi, des mutants de p53 au niveau du DBD, entravés dans leur activité de transcription, peuvent s'avérer plus efficaces dans l'avènement de l'apoptose que p53 sauvage. A titre d'exemples, nous pouvons citer les mutants S121A, S121C, S121F, H214Q et K291E (Kakudo *et al.*, 2005). De plus, p53 peut promouvoir l'apoptose alors que son importation nucléaire, et donc son activité transcriptionnelle, est inhibée (Chipuk *et al.*, 2004).

L'étude approfondie de ces voies a identifié la mitochondrie comme le site majeur de l'activité apoptotique indépendante de la transcription de p53. En effet, de nombreuses études rapportent que p53 peut se relocaliser et induire l'apoptose directement à la mitochondrie, par le biais de ses interactions avec les membres de la famille de Bcl-2 (Marchenko *et al.*, 2000; Moll and Zaika, 2001). Il a été démontré que p53 peut activer la voie apoptotique intrinsèque en induisant directement la PMME, entraînant la libération de facteurs apoptotiques depuis l'espace inter-membranaire vers le cytosol. L'accumulation de p53 à la mitochondrie a été décrite dans plusieurs systèmes expérimentaux – depuis des lignées cellulaires transformées jusqu'à des modèles animaux. Ces données sont détaillées au chapitre 3 de cette introduction.

Malgré les évidences d'une action directe de p53 à la mitochondrie, diverses études complexifient la signification de la localisation mitochondriale de p53 en situation de stress. Tout d'abord, p53 mitochondrial a été détecté en conditions apoptotiques mais aussi en conditions d'arrêt du cycle cellulaire. En effet, une importante translocation mitochondriale de p53 survient en réponse aux inhibiteurs de topoisomérase, ainsi que suite à une irradiation ionisante. Cependant, alors que la cellule succombe à l'apoptose dans le premier cas, elle ne subit qu'une sénescence dans le second. Dès lors, la translocation mitochondriale de p53 n'est pas toujours précurseur de mort cellulaire par apoptose (Essmann *et al.*, 2005).

Chapitre 2 : Les voies de l'apoptose

Alors que la plupart des données indiquent que p53 se localise au niveau ou à proximité de la membrane mitochondriale externe, quelques publications suggèrent qu'une partie de p53 se retrouve à l'intérieur de la mitochondrie, dans la matrice ou en association avec la membrane mitochondriale interne. La localisation de p53 à l'intérieur de la mitochondrie indiquerait un rôle dans la maintenance et la stabilité du génome mitochondrial (Achanta *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2003). Il a notamment été démontré que p53 interagit physiquement avec l'ADN mitochondrial ainsi qu'avec la polymérase γ de la mitochondrie. Ceci contribue à la correction d'erreurs lors de la réplication (Bakhanashvili *et al.*, 2008).

De plus, des données indiquent que p53 peut être localisé à la mitochondrie dans les cellules HCT116 (lignée cellulaire humaine issue d'un cancer du colon), en absence de stress (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004). Ferecatu et son équipe ont montré que p53 se situe à la mitochondrie dans des cellules vivantes en prolifération, issues de différentes espèces (le rat et l'homme) et indépendamment du statut de la cellule (tumeur, cellule immortelle ou primaire). En ce qui concerne les taux, cette étude indique que les ratio p53 mitochondrial/ p53 nucléaire ainsi que p53 mitochondrial/ p53 cytoplasmique sont supérieurs à 1 dans le cas de la lignée cellulaire humaine FH (Ferecatu *et al.*, 2009). Cette localisation mitochondriale de p53 en conditions normales concorde avec les observations d'une influence positive directe de p53 sur la biogenèse et l'activité mitochondriale. Cette influence se fait à travers des mécanismes indépendants de la voie transcriptionnelle nucléaire (Bensaad and Vousden, 2007).

Chapitre 3 : La famille de Bcl-2

La famille de Bcl-2 comprend 25 membres pro- et anti-apoptotiques, qui interagissent entre eux afin de favoriser ou non la (sur)vie de la cellule (Kang and Reynolds, 2009; Reed and Pellecchia, 2005a; Reed and Pellecchia, 2005b). Ses différents membres agissent en partie par interaction protéique, formant un réseau dynamique complexe d'homo et hétéro-oligomères suivant l'environnement cellulaire et leur localisation subcellulaire (Schmitt *et al.*, 2007). Ces protéines contrôlent la voie intrinsèque de l'apoptose. Ils intègrent aussi bien les données extra- que intra-cellulaires avant de sceller le destin de la cellule (Fadeel and Orrenius, 2005). Lorsque les membres anti-apoptotiques de cette famille sont surexprimés, le ratio entre membres pro- et anti-apoptotiques est perturbé et l'apoptose cellulaire peut être inhibée (Kang and Reynolds, 2009).

Cette famille est divisée en groupes suivant le nombre de domaines d'homologie (BH) d'une part, et leur fonction d'autre part (Fadeel and Orrenius, 2005). Tous les membres de la famille de Bcl-2 possèdent entre 1 et 4 domaines BH. Les membres qui en possèdent 4 (BH1-4) sont anti-apoptotiques (comme Bcl-2, Bcl-xl, Bfl-1,...) tandis que les autres membres sont pro-apoptotiques. Il faut cependant indiquer ici qu'il existe une controverse concernant le nombre de domaines BH que possède le membre anti-apoptotique Mcl-1. En

effet, certaines publications clament que Mcl-1 possède le domaine BH4 tandis que d'autres indiquent qu'il en est dépourvu (Green and Kroemer, 2005; Juin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 1995; Yip and Reed, 2008; Youle and Strasser, 2008). Ces divergences sont liées à la définition elle-même du domaine BH4, définition qui peut être plus ou moins stricte suivant les auteurs des différentes publications.

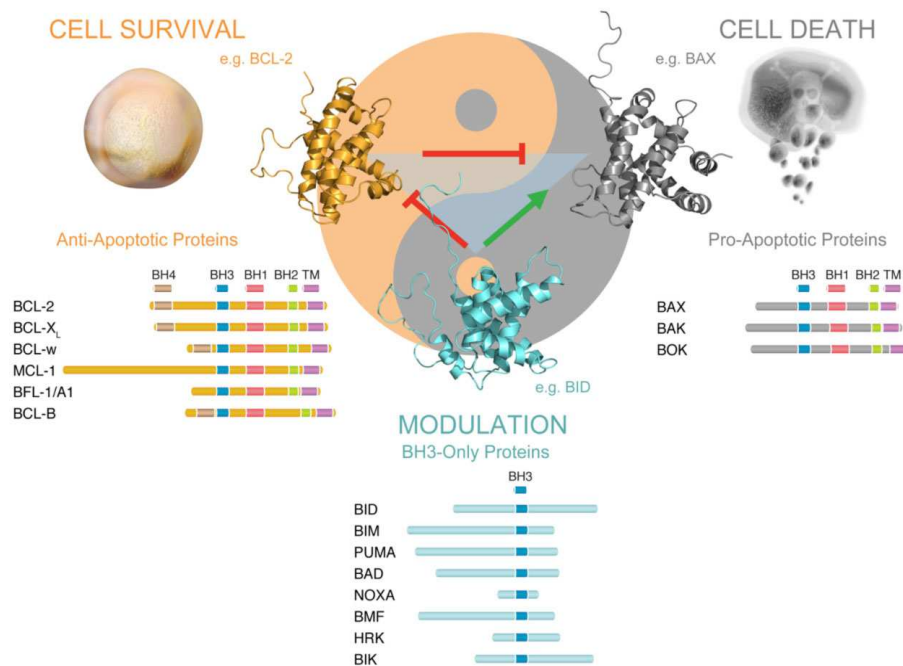


Figure 11: Famille Bcl-2.

Comparaison structurale des protéines de la famille Bcl-2. Les protéines de cette famille possèdent au moins un domaine d'homologie BH (BH1, BH2, BH3 ou BH4). Beaucoup possèdent aussi un domaine transmembranaire TM. Les membres anti-apoptotiques comprennent trois ou quatre domaines BH (le domaine BH4 est sujet à controverses) et inhibent les membres pro-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques sont divisées entre les « effectrices » multi-domaines et les BOPs. Les protéines effectrices Bax, Bak et Bok, comprennent les domaines BH1-3, qui forment une interface hydrophobe qui permet l'interaction avec les BOPs. Les BOPs ne possèdent que le domaine BH3, domaine requis pour les interactions avec les membres anti-apoptotiques (afin de les inhiber) et les membres effecteurs de la famille (afin de les activer). (Gavathiotis laboratory, <http://ambrosia.bioc.aecom.yu.edu/index.php?id=64>).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux catégories : les protéines multidomaines effectrices (Bax, Bak, Bok) qui exhibent les domaines d'homologie BH1-3 et les protéines qui ne partagent que le domaine d'homologie BH3, qu'on nomme BOPs (BH3 only proteins) (Chipuk *et al.*, 2010), (**Figure 11**). Les BOPs peuvent à leur tour être divisés en deux groupes : les membres qui peuvent lier directement et activer Bax et Bak (tels que Bid et Bim), et les membres qui ne peuvent lier directement Bax et Bak mais qui peuvent s'opposer aux membres anti-apoptotiques (Bad, Bik, Noxa, Puma, etc.) (Deng *et al.*, 2006).

Des expériences de mutagenèse ont indiqué que le potentiel de dimérisation des protéines de cette famille est grandement influencé par la combinaison spécifique des domaines BH (Schmitt *et al.*, 2007). En effet, les membres de cette famille qui partagent les domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3 ont une structure 3D semblable. Cette structure comprend un faisceau d'hélices qui forme une poche de surface hydrophobe (**Figure 12**) (Fesik, 2000; Jin and El-Deiry, 2005). Cette poche hydrophobe peut accueillir le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques, hélice amphipatique dont le cœur est formé par une séquence LXXXGDE (où X correspond à n'importe quel résidu) (Lanave *et al.*, 2004). La leucine et l'acide aspartique, résidus conservés, forment des interactions clés avec les protéines pro-survie. La leucine se retrouve dans l'interface entre protéines interagissantes. L'aspartate est exposée et forme une interaction ionique avec l'arginine conservée du domaine BH1 des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Hinds and Day, 2005). D'un autre côté, le motif conservé NWGR qui caractérise le domaine BH1 forme un motif en hélice au début de l'hélice $\alpha 5$, qui interagit aussi avec les résidus polaires des BOPs (**Figure 12**) (Day *et al.*, 2008).

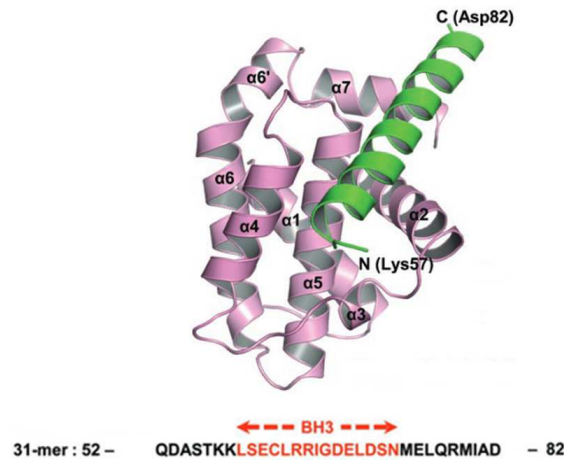


Figure 12: Structure 3D de Bcl-2 liant un peptide comportant le domaine BH3 de Bax.

Interactions entre Bcl-2 et le domaine BH3 du peptide Bax. Structure de Bcl-2 lié au peptide 31-mer Bax (résidus 52 à 82). Bcl-2 et Bax sont représentés en rose et vert respectivement. La séquence du peptide 31-mer Bax est indiquée, avec le domaine BH3 marqué en rouge (Ku *et al.*, 2011).

Toutes les protéines anti-apoptotiques utilisent la même interface de liaison avec les BOPs (Czabotar *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2003; Sattler *et al.*, 1997), mais leur profil de liaison diffère (Chen *et al.*, 2005). Chaque BOPs est capable de lier plusieurs membres anti-apoptotiques. Tandis que certains (par exemple Bid, Bim et Puma) lient tous les membres pro-survie avec une affinité équivalente, d'autres ont des spécificités plus définies (par exemple Noxa). Ces liaisons neutralisent les membres pro-survie de cette famille. Dans les cellules saines, les membres anti-apoptotiques agissent principalement en empêchant Bax et Bak de perturber l'intégrité des membranes, en particulier la membrane mitochondriale externe (Adams and Cory, 2007). Une caractéristique commune à tous les membres anti-apoptotiques de cette famille de Bcl-2 est leur capacité de séquestrer les membres pro-apoptotiques de la famille, aussi bien les BOPs que les multidomaines Bax et Bak (Vogler, 2012) (**Figure 13**).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

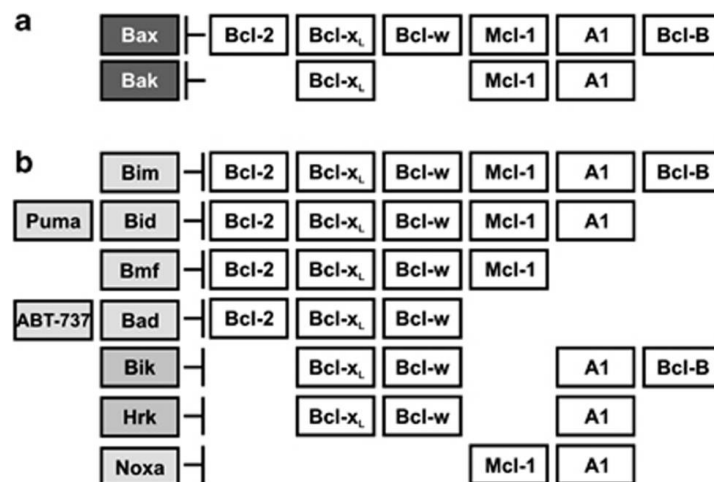


Figure 13: Relation entre les membres de la famille de Bcl-2.

(a) Bcl-B, Bcl-w et Bcl-2 inhibent sélectivement l'apoptose initiée par Bax. Bcl-x_L, Mcl-1 et A1 (Bfl-1) inhibent à la fois l'apoptose initiée par Bax et Bak. (b) Bim peut lier tous les membres anti-apoptotiques, tandis que les autres BOPs sont plus sélectifs. Bcl-B lie uniquement Bim et Bik. Les protéines pro-survie sont représentées dans des cases blanches, les BOPs dans des cases grises et les protéines pro-apoptotiques effectrices dans des cases noires. Les interactions sont indiquées lorsque les données de liaison suggèrent un $K_D < 100$ nM. (Rautureau *et al.*, 2012).

3.1. Présentation des différents membres de la famille Bcl-2

Chaque membre de la famille Bcl-2 est unique. Il possède ses propres propriétés moléculaires, ses activités biologiques, sa localisation cellulaire et ses ligands d'interaction qui reflètent ses rôles biologiques spécifiques (Rautureau *et al.*, 2012).

3.1.1. Les membres anti-apoptotiques

Le premier membre, **Bcl-2** (B-cell lymphoma 2) proto-oncogène de 26 kDa, a été identifié comme étant la deuxième protéine découverte en lien avec le lymphome folliculaire humain à cellules B. Ce cancer est en grande partie dû à la translocation des chromosomes 18 (gène Bcl-2) et 14 (gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines). La translocation de ces chromosomes a pour effet de placer le gène Bcl-2 à la suite du promoteur du gène codant pour

les chaînes lourdes des immunoglobulines. Ceci entraîne une surexpression de Bcl-2 (Tsujimoto *et al.*, 1984). Quelques années plus tard, il est établi que Bcl-2 ne promeut pas la prolifération mais bloque la mort cellulaire suite à des stimuli physiologiques et pathologiques. Dès lors, Bcl-2 devient emblématique d'un nouveau groupe d'oncogènes : les régulateurs de la mort cellulaire (Vaux *et al.*, 1988). La phosphorylation de plusieurs résidus dans la boucle flexible de la protéine est contrôlée par de multiples voies de signalisation de kinases et phosphatases, permettant la régulation de son activité anti-apoptotique (Ruvolo *et al.*, 2001). La fixation du récepteur nucléaire Nur77 (aussi connu sous le nom de TR3 et NGFI-B) peut convertir l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 en pro-apoptotique. Ceci a été observé dans certaines cellules cancéreuses du poumon, de la prostate, de l'ovaire, du colon et de l'estomac, où l'expression de Nur77 est accrue lors de l'apoptose (Kolluri *et al.*, 2008).

Bcl-xl (B Cell Lymphoma extra-large) a été la première protéine anti-apoptotique de cette famille à être étudiée au niveau de sa structure tridimensionnelle. Cette étude a établi que les hélices α situées dans les domaines BH1, BH2 et BH3 créent une poche hydrophobe. L'hélice α amphipatique du domaine BH3 des BOPs peut venir se loger dans cette poche, comme un ligand lie son récepteur (Sattler *et al.*, 1997).

Bcl-w (BCL2L2, Bcl-2 like 2) est peu étudiée dans la littérature. Bien qu'exprimée dans de nombreux tissus chez la souris (cerveau, testicules, pancréas, cœur, intestins (Gibson *et al.*, 1996)), la souris *Bcl-w* KO ne souffre d'aucune anomalie à l'exception d'une spermatogenèse défectueuse. Ceci suggère que cette protéine n'est indispensable que pour ce processus (Print *et al.*, 1998). Sa surexpression a été répertoriée dans plus de 90% des cancers colorectaux, généralement à un stade avancé. Curieusement, l'expression de Bcl-w est corrélée à l'expression de p53 sauvage dans ces cancers (Wilson *et al.*, 2000). Bcl-w est aussi fréquemment surexprimé dans les cancers gastriques, en particulier ceux qui sont en expansion (Lee *et al.*, 2003). Bcl-w favoriserait le potentiel migrateur et invasif des tumeurs gastriques en induisant la production de diverses protéines extracellulaires (Bae *et al.*, 2006). La surexpression de cette protéine anti-apoptotique protège la cellule contre l'apoptose induite par divers agents (Gibson *et al.*, 1996).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

Bfl-1 (Bcl-2 related gene expressend in fetal liver) (Choi *et al.*, 1995) est aussi connu sous le nom de BCL2A1 et GRS (Glasgow rearranged sequence, (Kenny *et al.*, 1997)). En effet, le gène codant pour cette protéine a été impliqué dans un réarrangement chromosomique chez un patient leucémique chronique. La cristallisation de sa structure en complexe avec des BOPs a montré que cette protéine possède aussi la boucle hydrophobe commune aux membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Herman *et al.*, 2008). Contrairement aux autres protéines pro-survie, Bfl-1 possède des résidus hydrophiles dans sa région C-terminale transmembranaire, ce qui lui permet d'adopter deux conformations distinctes. La première conformation donne lieu à une molécule compacte, l'hélice étant située dans la poche hydrophobe de Bfl-1. La seconde conformation est plus volumineuse grâce à l'hélice $\alpha 9$ qui s'étend hors du cœur de Bfl-1 (Brien *et al.*, 2009). La surexpression de Bfl-1 ne suffit pas à elle seule à entraîner la formation de tumeurs. En effet, les souris transgéniques qui sur-expriment Bfl-1 ne développent pas de lymphome, contrairement aux souris sur-exprimant Bcl-2. Bfl-1 est cependant surexprimé dans différents types de leucémies, lymphomes et tumeurs solides (sein, poumon, colon, ovaire, prostate, estomac), principalement aux stades avancés et métastatiques de la maladie (Beverly and Varmus, 2009; Choi *et al.*, 1995; Hoelzinger *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2000). De nombreuses études montrent que ce membre contribue à la progression tumorale. Ceci aurait lieu vraisemblablement par inhibition de l'apoptose dans les cellules tumorales ayant cumulé des anomalies génétiques et donc plus dépendantes des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Vogler, 2012).

Mcl-1 (Myeloid cell factor 1) se distingue des autres membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 par ses caractéristiques physiques et physiologiques. Il ne partage que 25% d'homologie de séquence avec les autres membres de sa famille (Fire *et al.*, 2010). Son temps de demi-vie est court, probablement à cause de la longue région N-terminale (~170 acides aminés) comprenant des sites de phosphorylation, qui influencent aussi sur sa localisation cellulaire. Cette longue région N-terminale est absente chez les autres membres de la famille Bcl-2 (Thomas *et al.*, 2010). Mcl-1 possède les domaines BH1, BH2 et BH3. Les données de la littérature sont contradictoires

en ce qui concerne le domaine BH4 : certains affirment que Mcl-1 en est pourvu tandis que d'autres soutiennent le contraire (Green and Kroemer, 2005; Yang *et al.*, 1995; Yip and Reed, 2008). Le profil de liaison entre Mcl-1 et les BOPs est différent de celui de Bcl-2 et de Bcl-xl, ce qui pourrait s'expliquer par l'absence du domaine BH4 (Chen *et al.*, 2005; Dutta *et al.*, 2010; Fire *et al.*, 2010). En ce qui concerne les interactions entre membres de la famille de Bcl-2, Mcl-1 a une grande affinité pour Bak (Zhai *et al.*, 2008). Mcl-1 possède des fonctions différentes par rapport aux autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Il est exprimé dans de nombreux tissus adultes, où il participe au développement et à l'homéostasie (Craig, 2002). Il participe à l'embryogenèse (Rinkenberger *et al.*, 2000), au développement et au maintien des cellules immunitaires (Opferman *et al.*, 2005). C'est un senseur du stress dû au manque de nutriments, entraînant l'autophagie suite à sa dégradation (Germain *et al.*, 2011). Mcl-1 travaille aussi en synergie avec p53 dans certains types cellulaires. En effet, les souris dépourvues du gène *Mcl-1* ou du gène *TP53* au niveau des hépatocytes survivent tandis que les souris dépourvues des deux gènes à la fois succombent, dans ~60% des cas, au stade néonatal. Ceci est attribué à une faible différenciation hépatocytaire. De plus, l'absence de p53 entraîne des fibroses ainsi que des développements de tumeurs chez la souris dépourvue du gène *Mcl-1* dans ce type cellulaire (Weng *et al.*, 2011). Le gène *Mcl-1* connaît également un épissage alternatif qui ne tient pas compte du second exon. Ceci entraîne la production d'un isoforme dépourvu de BH1, BH2 et du domaine transmembranaire (Bae *et al.*, 2000; Bingle *et al.*, 2000). La structure de cette isoforme est semblable à celle des BOPs (Gross *et al.*, 1999) et sa surexpression entraîne la mort cellulaire (Michels *et al.*, 2005).

Bcl-B est aussi connue sous le nom de Diva/Boo, étant donné l'homologie de sa séquence en acides aminés comparé à celle de la protéine Boo (Diva) murine (45,5% d'identité de séquence) (Rautureau *et al.*, 2012). L'ARNm de Bcl-B est exprimé dans de nombreux tissus humains adultes (Ke *et al.*, 2001). Une étude du profil d'expression de cette protéine dans le cancer humain est parue en 2008 (Krajewska *et al.*, 2008). En même temps, un compte rendu a été publié, indiquant que cette protéine ne pouvait pas encore être

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

catégorisée comme un membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 (Youle and Strasser, 2008). A ce jour, il a été démontré que Bcl-B possède un domaine BH1 et BH2, ainsi qu'un domaine transmembranaire (Ke *et al.*, 2001) mais ne possède pas le motif BH3 nécessaire à l'activité pro-apoptotique (Rautureau *et al.*, 2010b). Il ne partage que 25% d'identité avec les autres membres pro-survie (Rautureau *et al.*, 2012). Une expression élevée de Bcl-B a été reportée dans divers cancers tels que celui de l'ovaire et de la prostate, des myélomes multiples, des lymphomes et des lignées cellulaires leucémiques (Lee *et al.*, 2001; Luciano *et al.*, 2007; Zhai *et al.*, 2003). L'augmentation du niveau d'expression de la protéine Bcl-B due à l'amplification de son gène est associé à un mauvais pronostic dans divers cancers chez l'homme et prédit une résistance aux traitements (van de Kooij *et al.*, 2013; Yasui *et al.*, 2004). La surexpression de Bcl-B protège la cellule contre l'apoptose induite par Bax mais non celle induite par Bak, ce qui la rend moins efficace que d'autres membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2 ou Bcl-xl (Ke *et al.*, 2001). Bcl-B a une grande affinité pour le membre pro-apoptotique Bax (Zhai *et al.*, 2008).

Désormais, il est établi que les six membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1 et Bcl-B) peuvent participer au développement de cancers et contribuer à la résistance contre les traitements thérapeutiques (Rooswinkel *et al.*, 2014). Bien que les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 possèdent en partie une fonction redondante, ils possèdent aussi des fonctions propres. En effet, Bcl-2 est nécessaire à la survie des cellules rénales, des cellules souches mélanocytaires et des lymphocytes B et T (Nakayama *et al.*, 1993). La survie des érythrocytes et des cellules neuronales dépend de Bcl-xl (Motoyama *et al.*, 1999). La perte de Bcl-w entraîne une spermatogenèse défectueuse (Print *et al.*, 1998; Roset *et al.*, 2007) et la perte de Bfl-1 provoque une diminution du nombre de cellules neutrophiles (Hamasaki *et al.*, 1998). Enfin, Mcl-1 est indispensable à la survie et à l'implantation du zygote (Rinkenberger *et al.*, 2000) et possède un rôle clé dans la genèse des lymphocytes B et T et dans l'hématopoïèse précoce (Opferman *et al.*, 2005).

3.1.2. Les membres pro-apoptotiques

Bax et **Bak** possèdent des fonctions redondantes dans la mesure où l'absence de l'un des deux gènes n'a pas ou peu d'impact dans la plupart des cellules et des tissus. L'absence de Bax entraîne des défauts dans la spermatogenèse et une hyperplasie bénigne des lymphocytes (Knudson *et al.*, 1995; Lindsten *et al.*, 2000). L'absence des deux protéines à la fois bloque l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Wei *et al.*, 2001). La principale différence biochimique entre ces deux membres, dans les cellules saines, est que Bax est plutôt cytosolique et occasionnellement associé à la mitochondrie, tandis que Bak est une protéine membranaire présente à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique. La liaison entre Bax/Bak et certains BOPs entraîne un changement de conformation de leur région N-terminale (Azad *et al.*, 2012). De même, p53 peut activer Bax et Bak par interaction directe, mais sa liaison avec Bak se fait sur un site distinct par rapport à celui des BOPs (Pietsch *et al.*, 2008).

Bax peut adopter deux conformations stables différentes : la conformation native présente dans le cytosol, et la conformation « active » responsable de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Dans sa conformation native, la poche hydrophobe de Bax est occupée par son hélice $\alpha 9$, tandis que de nombreux résidus polaires sont exposés, ce qui augmente la solubilité de la protéine (Lalier *et al.*, 2007). En réponse à des signaux cytotoxiques, Bax subit un changement de conformation au niveau de sa région N-terminale. Ceci entraîne un réarrangement intramoléculaire qui libère son hélice $\alpha 9$ et expose des domaines hydrophobes, ce qui augmente l'affinité de la protéine pour les membranes biologiques (**Figure 14**), (Gavathiotis *et al.*, 2008; Lalier *et al.*, 2007). Bax transloque alors à la membrane mitochondriale ou à celle du réticulum endoplasmique, change de conformation et s'assemble de façon asymétrique en homo-oligomères (Adams and Cory, 2007). Il a été démontré que Bax dispose d'une grande affinité pour Bcl-B, d'une affinité équivalente pour Bfl-1 et Bcl-xl, et enfin d'une affinité moindre pour Mcl-1 et Bcl-2 (Zhai *et al.*, 2008).

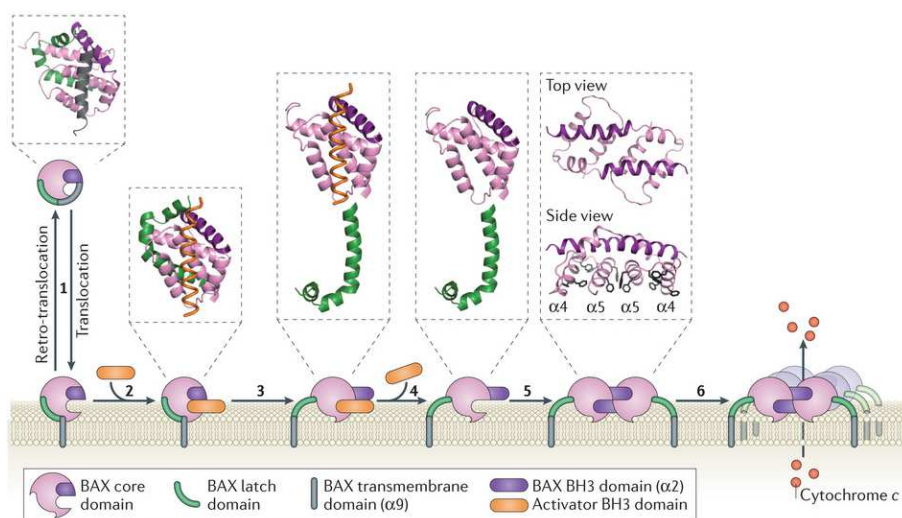


Figure 14 : Oligomérisation de Bax et Bak

La figure illustre les transitions structurales de Bax et Bak. Ces transitions sont proposées dans des études de crosslinking, de mesures biophysiques, d'association de peptides BH3 et par la structure tridimensionnelle de Bax. La première étape montre la translocation de Bax à la membrane mitochondriale externe et sa rétro-translocation vers le cytosol. La translocation mitochondriale de Bax peut être déclenchée ou augmentée par l'interaction avec une protéine BH3-only. Le domaine transmembranaire (TM) libéré de la poche de Bax peut s'insérer dans la membrane mitochondriale externe, générant une forme liée de la protéine Bax (qui ressemble alors à Bak). Dans l'étape 2, un domaine BH3 activateur lie la poche de Bax. À l'étape 3, le domaine noté « core domain » dans la figure est libéré, car la liaison de l'activateur favorise la libération du domaine de Bax noté « latch domain » dans la figure. Ceci déstabilise le domaine BH3 de Bax, $\alpha 2$. Cette étape n'a pas encore été documentée pour Bak. Le domaine BH3 activateur se dégage ensuite lors de l'étape 4. Dans l'étape 5, la saillie du domaine BH3 permet à deux molécules Bax de s'associer pour former un dimère. La structure du noyau Bax ($\alpha 2$ - $\alpha 5$) en tant que dimère symétrique révèle une couche hydrophobe de deux hélices $\alpha 4$ et deux hélices $\alpha 5$ avec 12 résidus aromatiques en saillie (vue de côté). Bien qu'il soit difficile de savoir comment les oligomères plus grands se forment (étape 6), la surface centrale de $\alpha 4$ - $\alpha 5$ pourrait engager le feuillet externe de la membrane mitochondriale externe, induisant ainsi les tensions et contribuant à la perméabilisation de la membrane (Czabotar *et al.*, 2014).

Le membre **Bak** interagit avec une grande affinité avec Bcl-xl et Mcl-1, une affinité moindre pour Bfl-1 et Bcl-2. La liaison entre Bak et Bcl-B n'a pas été observée (Zhai *et al.*, 2008). Un modèle a été proposé concernant le mécanisme d'oligomérisation de Bak, où la protéine présente son domaine BH3 qui s'insère dans la poche hydrophobe d'un second Bak (Dewson *et al.*, 2008). Ceci entraîne alors la formation de dimères symétriques qui s'assemblent ensuite en des structures plus importantes. Ces structures sont capables de perméabiliser la membrane mitochondriale en utilisant l'interface entre les hélices $\alpha 6$ (**Figure 12**), (Dewson *et al.*, 2009). Dans ce modèle, l'interaction entre Bak et les BOPs est nécessairement transitoire, sans quoi les interactions nécessaires à la formation de dimères ne seraient pas possible. Contrairement à Bax, Bak ne possède pas de site de liaison pour les BOPs au niveau de la région N-terminale, et son hélice $\alpha 9$ est insérée dans la membrane mitochondriale externe. Dès lors, cette hélice $\alpha 9$ ne bloque pas l'accès à la boucle hydrophobe. Un autre mécanisme est mis en place pour éviter une activation inappropriée de Bak par les BOPs : la phosphorylation de la sérine 117. Cette phosphorylation a deux fonctions : celle d'empêcher d'une part l'interaction entre Bak et les BOPs et, d'autre part, celle de prévenir la dimérisation de Bak dans la cellule saine (Azad *et al.*, 2012). Une série de déphosphorylations est requise pour permettre l'activation de Bak et induire la mort cellulaire suite à un stimulus apoptotique. La première concerne la tyrosine Y108, déphosphorylation qui permet l'activation de Bak sans pour autant que la conformation de celle-ci ne change (Fox *et al.*, 2010). La seconde est dirigée contre la sérine S117, déphosphorylée afin de permettre à la poche hydrophobe de Bak de lier un domaine BH3 (Azad *et al.*, 2012). La protéine p53 peut aussi lier Bak, à un site distinct de la poche hydrophobe, indépendamment de la déphosphorylation de S117. Ce site implique les résidus Glu24, Glu25 et Arg160 et entraîne également un changement de conformation de la région N-terminale (Pietsch *et al.*, 2008). Dès lors, deux routes distinctes peuvent être employées afin d'induire le changement de conformation de Bak : en passant par la poche hydrophobe lorsque celle-ci est accessible, ou bien via liaison de p53 (Azad *et al.*, 2012).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

Le membre **Bok** interagit avec Mcl-1 et Bfl-1, mais n'a pas d'interaction avec Bcl-2 ni Bcl-xl (Hsu *et al.*, 1997a; Inohara *et al.*, 1998). Il est notoire que Bok peut induire la mort cellulaire, sa surexpression entraînant la mort de plusieurs lignées cellulaires en activant la voie apoptotique intrinsèque (Echeverry *et al.*, 2013). Cependant, le mécanisme exact est peu connu et peut inclure aussi bien la voie dépendante que la voie indépendante des caspases (Hsu *et al.*, 1997a; Hsu and Hsueh, 1998; Inohara *et al.*, 1998). Etant donné la haute similarité de séquence entre Bok et les autres membres effecteurs (en particulier au niveau des domaines BH1-3), il a été supposé que la fonction de Bok serait semblable à celle de Bax et Bak (Bartholomeusz *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 1997a; Inohara *et al.*, 1998; Ke *et al.*, 2012; Yakovlev *et al.*, 2004). Pourtant, la résistance manifeste à de nombreux stimuli apoptotiques des cellules privées de Bax et Bak mais pourvues de niveaux détectables de Bok, indique que Bok ne peut se substituer à Bax ou à Bak et qu'il pourrait donc avoir un rôle en amont de ceux-ci (Echeverry *et al.*, 2013; Lindsten *et al.*, 2000; Rathmell *et al.*, 2002). Il n'est pas aisé d'attribuer une fonction spécifique à Bok dans la mesure où les souris *Bok*^{-/-} se développent normalement. De plus, l'individu adulte ne présente aucune anomalie (Ke *et al.*, 2012). Néanmoins, il a été démontré que le gène *Bok* est fréquemment délété dans le cancer humain, ce qui suggère que la protéine Bok pourrait être un suppresseur de tumeur (Beroukhim *et al.*, 2010). Détectée dans la plupart des tissus, bien que généralement à de faibles niveaux (Ke *et al.*, 2012), la protéine Bok est localisée au niveau de la mitochondrie, mais aussi au réticulum endoplasmique et au noyau (Bartholomeusz *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2005; Yakovlev *et al.*, 2004). En particulier, Bok serait principalement présent au niveau des membranes de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, son domaine transmembranaire ayant une grande affinité pour ces deux organelles. Il est donc probable que cette protéine exerce une fonction importante dans ces compartiments cellulaires, dont il favorise la fragmentation suite à l'activation des caspases (Echeverry *et al.*, 2013).

Les **BOPs** sont des senseurs apoptotiques en amont dans la voie apoptotique mitochondriale, à cause de leur activation précoce et sélective suivant les signaux de stress (Youle and Strasser, 2008). Ils entraînent l'apoptose en réponse à des défauts de développement, à des insuffisances trophiques et à des dommages intracellulaires. Ces protéines sont donc des sentinelles des dommages intracellulaires. Le domaine BH3 est exposé chez tous les BOPs, à l'exception de Bid (Juin *et al.*, 2005). En conséquence, dans les cellules saines, les BOPs sont inhibés soit de façon transcriptionnelle, comme Puma et Noxa dont l'expression est régulée par le suppresseur de tumeur p53, soit de façon post-traductionnelle (Bad, Bim). En tant qu'exception, Bid est une protéine cytosolique inactive dans les cellules saines, qui lors de l'apoptose subit un clivage protéolytique responsable de son activation (tBid) et de l'exposition de son domaine BH3 (Lalier *et al.*, 2007). L'activation de Bak et Bax par les BOPs peut se faire selon deux modèles.

1) Le modèle d'*activation directe* (**Figure 15**). Ce modèle implique les BOPs activateurs, tels que Bim et tBid, qui lient directement Bax et Bak pour les activer (Certo *et al.*, 2006; Chipuk *et al.*, 2010; Kuwana *et al.*, 2002; Letai *et al.*, 2002). Ces interactions induisent un changement de conformation des membres effecteurs, permettant leur intégration dans la membrane mitochondriale externe (Youle and Strasser, 2008). Dans ce modèle, les BOPs non activateurs, nommés sensibilisateurs, lient les protéines anti-apoptotiques afin d'en libérer Bim et tBid.

2) Le modèle d'*activation indirecte* suggère que les BOPs interagissent avec les membres anti-apoptotiques, les empêchant ainsi d'interagir avec Bax et Bak et donc de les inhiber. Dans ce modèle Bim et tBid sont les BOPs les plus importants car ils peuvent interagir avec tous les membres anti-apoptotiques (Chen *et al.*, 2005). Des tests fonctionnels ont démontré que la neutralisation de plusieurs protéines anti-apoptotiques par des BOPs est nécessaire et apparemment suffisante pour permettre l'apoptose dépendante de Bax.

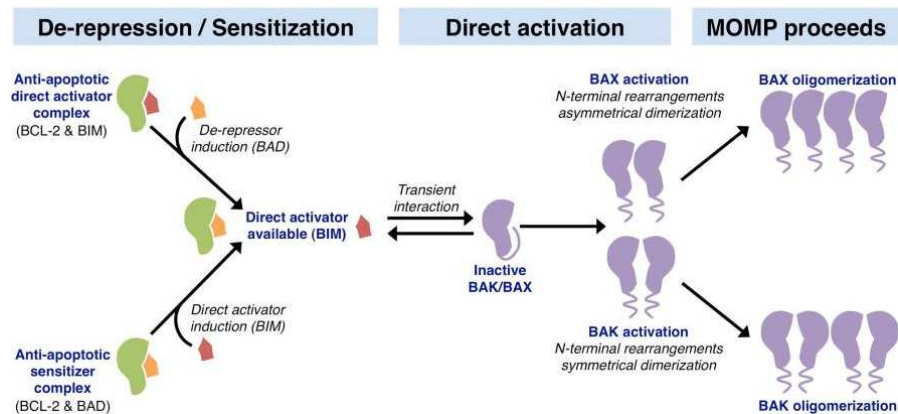


Figure 15: Mécanisme d'activation de Bax et Bak.

Des membres anti-apoptotiques lient et séquestrent les BOPs activateurs directs. Suite à un stress, un BOP dé-répresseur tel que Bad est induit, permettant la libération de l'activateur direct tel que Bim qui peut alors activer Bax et Bak. Le modèle sensibilisateur implique la liaison et l'inactivation des membres anti-apoptotiques par les BOPs sensibilisateurs (inactivation de Bcl-2 par Bad par exemple). Cette sensibilisation prévient l'inhibition du BOP activateur direct (Bim par exemple) suite à un stimulus apoptotique, diminuant ainsi le niveau minimum d'activateurs directs nécessaire à l'activation des effecteurs Bax et Bak. Le BOP activateur direct libre active alors Bax et Bak suite à une interaction transitoire. Cette interaction entraîne un changement de conformation au niveau du N-terminal, ce qui expose le domaine BH3 de Bax et Bak. Une fois activés, les monomères Bak s'assemblent en paires symétriques. Ces dimères oligomérisent pour perméabiliser la membrane mitochondriale externe, entraînant la PMME. En revanche, les monomères Bax s'assemblent par paires asymétriques, oligomérisent et entraînent la PMME (Anvekar *et al.*, 2011).

3.2. Localisation des membres de la famille de Bcl-2

Les membres de la famille de Bcl-2 sont généralement localisés dans des compartiments différents en absence de signaux de mort cellulaire. Les membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-2 et Bcl-xl, sont plutôt localisés sur la face cytoplasmique de la membrane mitochondriale externe, du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire (Hockenbery *et al.*, 1990; Krajewski *et al.*, 1993; Zamzami *et al.*, 1996). En revanche, les membres pro-apoptotiques tels que Bax ou Bid sont plutôt cytosoliques dans les cellules non stressées. La protéine multidomaine Bak réside quant à elle de façon constitutive dans la membrane mitochondriale externe ou dans la membrane du réticulum endoplasmique (Gross *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1997b; Korsmeyer *et al.*, 2000). Dans les cellules saines, Bcl-xl et Bcl-w sont situés dans le cytosol car leur domaine transmembranaire C-terminal est inaccessible. En effet, Bcl-xl peut former un homodimère en insérant son C-terminal dans la poche hydrophobe de son partenaire (Jeong *et al.*, 2004). Le domaine transmembranaire de Bcl-w peut occuper sa propre poche hydrophobe (Denisov *et al.*, 2003; Hinds *et al.*, 2003). Le domaine transmembranaire C-terminal des membres anti- et pro-apoptotiques, région hydrophobe, est essentiel à leur capacité d'ancrage dans la membrane ainsi qu'à leur stabilité (Borner *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1994).

Suite à un signal de mort, les protéines multidomaines pro-apoptotiques subissent un changement de conformation. Ceci leur donne la capacité de cibler et de s'insérer dans les membranes cellulaires, en particulier celle de la mitochondrie (Borner *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1994). Ainsi, il a été proposé que l'interaction du domaine BH3 d'un BOPs avec la boucle hydrophobe de Bcl-xl et Bcl-w libérerait le domaine transmembranaire et les deux protéines pourraient alors transloquer à la mitochondrie (Jeong *et al.*, 2004; Wilson-Annan *et al.*, 2003). Contrairement aux membres Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w, le domaine C-terminal de Bfl-1 possède des résidus hydrophiles qui interrompent son domaine transmembranaire hydrophobe (D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998). L'ancrage de Bfl-1 à la mitochondrie ainsi que sa fonction anti-apoptotique dépendent de la nature amphipathique de son hélice C-terminale. Cette hélice $\alpha 9$ peut adopter deux conformations différentes. Dans un cas, l'hélice est

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

située dans la poche hydrophobe, transformant Bfl-1 en une molécule compacte qui limite l'accès de sa poche aux BOPs. Dans le second modèle, la molécule est plus étendue, l'hélice $\alpha 9$ saillant du cœur de la molécule et dès lors potentiellement impliquée dans l'interaction avec des membranes. Bfl-1 peut coexister sous ces deux formes différentes, sa localisation varie donc en fonction du type cellulaire ainsi que de l'état de stress de la cellule. Suite à un stimulus apoptotique, Bcl-w et Bcl-xl cytosoliques transloquent à la mitochondrie tandis que Mcl-1 est rapidement dégradé par le protéasome (Brien *et al.*, 2009).

La localisation des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 influe aussi sur leur rôle. Ainsi, Bcl-2 qui est localisé à la mitochondrie, au réticulum endoplasmique et à la membrane nucléaire, est impliqué dans l'homéostasie (maintient de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe, régulation du calcium dans la cellule) et dans l'équilibre des interactions entre les différents membres de sa famille (Jin and El-Deiry, 2005). Il semblerait que les membres de la famille de Bcl-2 agissent également au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, Bax et Bak sont essentiels à la voie apoptotique du réticulum endoplasmique ainsi qu'au maintien de l'homéostasie du calcium au sein de cette organelle. Une surexpression de Bcl-2 diminue la concentration mitochondriale en calcium et augmente celle du réticulum endoplasmique. Cet effet est contrebalancé par la surexpression de Bax ou Bak (Zong *et al.*, 2003). Pour entraîner une réponse apoptotique suite à certains stimuli (staurosporine et étoposide par exemple), Bax et Bak agissent à la fois sur le réticulum pour permettre la libération de calcium, et sur la mitochondrie pour perméabiliser sa membrane externe (Scorrano *et al.*, 2003; Zong *et al.*, 2003).

3.3. Régulation du niveau et de l'activité des membres de la famille de Bcl-2

Le niveau et l'activité des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sont régulés par divers mécanismes, y compris le contrôle de la transcription et les modifications post-traductionnelles. La protéine p53 régule positivement l'expression d'un certain nombre de gènes en réponse à un stress génotoxique, dont des protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 telles que Bax, Bak, Puma et Noxa. En régulant également négativement l'expression de membres anti-apoptotiques de cette famille, le gène codant pour Bcl-2 par exemple, p53 intervient dans l'équilibre apoptotique assuré par les membres de cette famille (Miyashita and Reed, 1995). D'autre part, les niveaux de Bcl-xl, Bfl-1 et Mcl-1 sont corrélés à la présence de cytokines, qui affectent à la fois leur production et leur stabilité (Adams and Cory, 2007). L'activité de Bcl-2 est aussi contrôlée par phosphorylation : la phosphorylation en sérine 70 est nécessaire à son activité anti-apoptotique, tandis que la phosphorylation multiple de T69, S70 et S87 inactive la protéine (Deng *et al.*, 2004). La boucle flexible de Bcl-xl est désaminée sur deux asparagines lorsque la cellule connaît des dommages à l'ADN, inhibant son action sur la survie cellulaire (Deverman *et al.*, 2002). Enfin, Mcl-1 est une protéine particulièrement instable, rapidement dégradée par le protéasome en réponse à des signaux cytotoxiques (Cuconati *et al.*, 2003; Nijhawan *et al.*, 2003).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

3.4. Régulation du cycle cellulaire par les membres de la famille de Bcl-2

Parmi les membres de la famille de Bcl-2, certains sont aussi impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, Bcl-2 ralentit la transition entre les phases G0 et G1, avant la réplication de l'ADN. Ceci a été reporté pour plusieurs lignées ainsi que dans le cas de souris transgéniques. Au contraire, les cellules *Bcl-2*^{-/-} entrent en phase S beaucoup plus rapidement. Concernant Mcl-1, il inhibe la progression de la phase S du cycle en interagissant avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen), régulateur du cycle cellulaire qui joue un rôle critique dans la réplication de l'ADN. D'autres travaux ont montré que Bcl-xl colocalise et lie CDK1 pendant la transition G2/M. La surexpression de Bcl-xl entraîne l'arrêt du cycle à ce stade, provoquant un programme de sénescence suite à un dommage à l'ADN (Schmitt *et al.*, 2007).

3.5. Régulation du PTP par les membres de la famille de Bcl-2

Il existe deux modèles de PMME, déjà décrits dans le chapitre 2 de cette thèse. Nous allons à présent souligner les rôles des membres de la famille Bcl-2 dans l'ouverture du PTP (**Figure 16**). Les molécules pro-apoptotiques telles que Bax pourraient lier ANT et promouvoir l'ouverture du PTP, effet empêché par le membre anti-apoptotique Bcl-2 (Marzo *et al.*, 1998). Les protéines multidomaines Bax et Bak pourraient interagir avec VDAC1, favorisant son activité de formation de canaux pour permettre le passage du cytochrome c, tandis que le domaine BH4 des membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl stimulerait plutôt la fermeture du canal (Shimizu and Tsujimoto, 2000). Le BOP Bim, mais non Bid, pourrait aussi interagir avec VDAC1 et promouvoir son ouverture, ce qui entraîne une chute du potentiel transmembranaire et une libération de cytochrome c (Schmitt *et al.*, 2007).

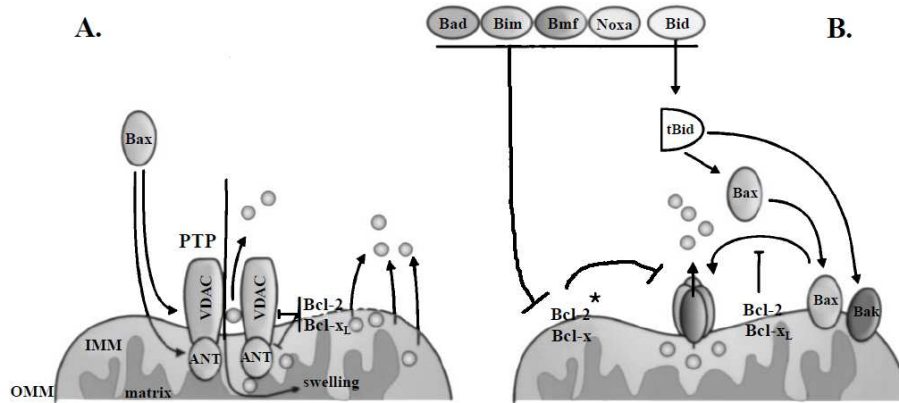


Figure 16: Perméabilisation de la MME et régulation par les membres de la famille de Bcl-2.

(A) Modèle du PTP. Le PTP consiste en un complexe de protéines dont les composants principaux sont VDAC dans la membrane mitochondriale externe (OMM) et ANT dans la membrane mitochondriale interne (IMM). Certains membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, tel que Bax, lient le complexe PTP et induisent son ouverture, permettant la libération de protéines contenues dans l'espace intermembranaire. Dans un autre modèle, la libération des protéines de l'espace intermembranaire résulte de la rupture de l'OMM, suite au gonflement de la matrice mitochondriale. Les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, tels que Bcl-2 et Bcl-x_L, inhibent l'ouverture du PTP. (B) Modèle Bax/Bak. Le BOP tBid interagit avec Bax cytosolique, induisant sa translocation et son oligomérisation dans l'OMM. Le BOP tBid peut aussi transloquer à la mitochondrie pour activer Bak. Bax et Bak forment des canaux qui permettent le passage de protéines contenues dans l'espace intermembranaire dont le cytoplasme. Les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, tels que Bcl-2 et Bcl-x_L, inhibent le changement de conformation nécessaire à l'oligomérisation de Bax et Bak. Les BOPs Bad, Bim, Bmf et Noxa lient les membres anti-apoptotiques afin de les inhiber (van Loo *et al.*, 2002).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

3.6. Cancer et famille de Bcl-2

Une dérégulation des membres de la famille de Bcl-2, corrélée à une résistance à l'apoptose, est observée dans de nombreux cancers humains. Cette perte d'équilibre peut être due soit à une diminution de l'activité des membres proapoptotiques, associée à la progression tumorale (Fecker *et al.*, 2006; Tchernev and Orfanos, 2007), soit à une augmentation de l'activité des membres anti-apoptotiques. Une activité moindre des membres pro-apoptotiques est observée dans de nombreux cas de mélanome, par exemple. Une activité accrue des membres pro-survie est un événement présent dans de nombreux cancers. Nous illustrerons ces deux cas ci-dessous.

Les voies qui promeuvent le développement de mélanomes chimiorésistants comprennent entre autres la mutation de la kinase B-RAF (Davies *et al.*, 2002), ce qui lui confère une hyper activité. Ceci entraîne une sur-stimulation de la voie de signalisation MAPK/ERK (Wan *et al.*, 2004) ainsi qu'une phosphorylation accrue de Bim, favorisant sa dégradation par le protéasome (Cartlidge *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2009; Sheridan *et al.*, 2008). La diminution des niveaux de Bim ainsi que de toutes les voies apoptotiques directement régulées par ce BOP entraîne une résistance à l'apoptose (Bouillet *et al.*, 1999). De nombreuses études suggèrent que l'hyper activité de B-RAF et MAPK entraîne une phosphorylation et inactivation excessives de Bad ainsi qu'une diminution de l'expression de Puma. Tous ces événements entraînent l'abrogation de l'activation de Bax/Bak, de la PMME et de l'apoptose (Cartlidge *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2009; Shao and Aplin, 2010; Sheridan *et al.*, 2008).

Six membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été identifiés et la plupart d'entre eux contribuent à la résistance des cellules face aux traitements anticancéreux (Reed and Pellecchia, 2005b). Les cellules cancéreuses ont la possibilité d'exprimer alternativement les différents membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Anvekar *et al.*, 2011). Ainsi, une surexpression de la protéine Bcl-2 a été observée dans les myélomes multiples, la leucémie lymphocytaire aiguë et chronique, et la leucémie myélogène aiguë (Kitada *et al.*, 2002). Le point commun des lymphomes folliculaires est la translocation chromosomale t(14:18) qui associe le

gène *Bcl-2* au locus de la chaîne lourde des immunoglobulines, augmentant ainsi l'expression du gène *Bcl-2* (Jin and El-Deiry, 2005). Un niveau élevé de *Bcl-2* par rapport à *Bax* a été associé à une progression des leucémies lymphocytaires chroniques, une plus courte période de rémission après traitement et une espérance de vie amoindrie (McConkey *et al.*, 1996). Des niveaux élevés de *Bcl-2* et *Bcl-xl* sont associés à un phénotype tumoral agressif et/ou résistant à diverses catégories d'agents chimio-thérapeutiques dans des cancers hématologiques et tumeurs solides (Minn *et al.*, 1995; Reed, 2008). Une surexpression de la protéine *Mcl-1* a également lieu dans les leucémies aiguës, lors de rechutes post-chimiothérapies (Kaufmann *et al.*, 1998). Les cellules qui surexpriment *Bcl-1* acquièrent une résistance à l'étoposide (Wang *et al.*, 1999), à la staurosporine (Shim *et al.*, 2000), à la cisplatine (Cheng *et al.*, 2000) et même à l'inhibiteur ABT-737, spécifique de *Bcl-2*, *Bcl-xl* et *Bcl-w* (Yecies *et al.*, 2010). Il est donc crucial de prendre en considération le statut de *Bcl-1* au moment de choisir la bonne thérapie.

Ces données suggèrent que les thérapies contre le cancer qui ciblent directement les membres anti-apoptotiques de la famille *Bcl-2*, et indirectement la machinerie pro-apoptotique qu'ils contrôlent, sont prometteuses. L'inhibition des membres anti-apoptotiques de la famille de *Bcl-2* ou l'activation des membres pro-apoptotiques pourrait s'avérer fructueuse pour combattre la résistance des cellules cancéreuses face à l'apoptose (Fadeel and Orrenius, 2005).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

3.6.1. Inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques

Une approche concernant les nouvelles thérapies anti-cancéreuses implique l'inhibition des inhibiteurs endogènes de l'apoptose, tels que les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et la famille des IAPs. En effet, l'inhibition des IAPs dont l'activité favorise la survie peut suffire à l'élimination sélective des cellules cancéreuses (Juin *et al.*, 2013). Pour cela, des peptides ou des petites molécules de structure semblable aux protéines BOPs permettraient de libérer les BOPs endogènes de leur séquestration par les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Fadeel and Orrenius, 2005). Grâce aux études réalisées sur la cristallisation du complexe Bcl-xl avec le domaine BH3 de Bak, la poche hydrophobe de Bcl-xl a pu être caractérisée. Elle a été utilisée pour la recherche de molécules susceptibles de s'y fixer (Sattler *et al.*, 1997).

La structure de la protéine Bcl-2 a été modélisée et la molécule HA14-1 a été sélectionnée suite à une recherche virtuelle assistée par ordinateur. Son affinité pour Bcl-2 est relativement haute par rapport à d'autres inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques (Wang *et al.*, 2000). Par la suite, la méthode du FPA (fluorescent polarization assay) a été développée. Cette méthode utilise des peptides BH3 conjugués à la fluorescéine ainsi que des protéines anti-apoptotiques recombinantes de la famille Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2002). Grâce au FPA, de nombreux inhibiteurs à large spectre de la famille Bcl-2, d'affinité modérée, ont été découverts. Parmi ceux-ci, on retrouve BH3-1 (inhibiteur de Bcl-xl), le gossypol (produit naturel isolé des graines et racines de coton) et GX15-070 (aussi connu sous le nom d'obatoclax, inhibiteur BH3-mimétique) (Degterev *et al.*, 2001; Kitada *et al.*, 2003; Shore and Viallet, 2005).

Ultérieurement, une méthode basée sur la résonance magnétique nucléaire appelée « SAR by NMR » a été utilisée afin de parcourir des bases de données chimiques à la recherche de petites molécules qui pourraient fixer la poche hydrophobe de Bcl-xl (Oltersdorf *et al.*, 2005; Shuker *et al.*, 1996). Cette technologie identifie plusieurs composés de faible poids moléculaire qui peuvent lier simultanément des sites voisins à la surface de la protéine. Sur base de ces informations structurelles, ces composés peuvent être liés

afin de produire un ligand dont l'affinité de liaison est théoriquement la somme des pièces individuelles (Hajduk, 2006). ABT-737 est un composé élaboré suivant ces méthodes. C'est une molécule inhibitrice de Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w. Elle n'enclenche pas directement l'apoptose mais amplifie les signaux de mort cellulaire émis par des chimiothérapies ou radiothérapies. ABT-737, et sa forme bio-disponible ABT-263, agissent donc comme un dé-répresseur des BOPs. Il ne fixe cependant pas Bfl-1, Mcl-1 et Bcl-B (Oltersdorf *et al.*, 2005).

A ce jour, il existe de nombreuses molécules inhibitrices des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Table 1), (Juin *et al.*, 2013). Par exemple, ABT-263, GX15-070 et AT-101 (dérivé du gossypol), testés cliniquement, ont démontré leur efficacité dans une panoplie de systèmes cellulaires (Juin *et al.*, 2013; Liu and Wang, 2012). La sélectivité de certaines molécules vis-à-vis de membres anti-apoptotiques spécifiques de la famille de Bcl-2 peut cependant rapidement entraîner une résistance de la cellule face à cet inhibiteur (Goldsmith *et al.*, 2012; Merino *et al.*, 2012). La voie primaire de résistance contre ABT-737 semble être une surexpression de Mcl-1 puisque le composé ne cible pas ce membre anti-apoptotique (Konopleva *et al.*, 2006). Le composé TW-37, qui cible Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1 (Verhaegen *et al.*, 2006) pourrait donc être utilisé en synergie afin de contrecarrer la résistance de la cellule. Les inhibiteurs à large spectre des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, à forte affinité, pourraient également s'avérer plus toxiques que bénéfiques pour le patient puisque les cellules saines nécessitent ces membres pour survivre. Ainsi, les inhibiteurs sélectifs ont l'avantage d'être plus sûrs, malgré le risque que les cellules cancéreuses développent une résistance. Traiter le patient avec plusieurs inhibiteurs simultanément serait imprudent vu les risques de toxicité (Juin *et al.*, 2013). En revanche, un traitement séquentiel éviterait le développement de résistances et aurait l'avantage de minimiser les effets secondaires (Liu and Wang, 2012).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

Molécule	Targets (IC ₅₀ (μM))	Design or screening method used
HA-14	BCL-2 (>100)	Computer-based
BH3Is	BCL-2 (1.14), BCL-W (2.33), BCL-B (1.08) and MCL1 (2.17)	Fluorescence polarization
Antimycin A3	BCL-2 (2.95), BCL-X _L (2.7), BCL-B (1.83) and MCL1 (2.51)	Computer-based
Chelerythrine	BCL-2, BCL-X _L and BCL2-A1 (all ~10)	Fluorescence polarization
ABT-737 and ABT-263	BCL-2 (0.12), BCL-X _L (0.064) and BCL-W (0.024)	Structure-function analysis and NMR
ABT-199	BCL-2 (<0.01)	X-ray structure-based reverse engineering
Obatoclax (GX015-070)	BCL-2 (1.11), BCL-B (2.15) and MCL1 (2.90)	Computer-based
Gossipol (AT-101)	BCL-2 (0.28), BCL-W (1.4), BCL-B (0.16) and MCL1 (1.75)	NMR and fluorescence polarization
Apogossypol (ApoG2)	BCL-2 (0.64), BCL-X _L (2.8), BCL-W (2.1) and BCL-B (0.37)	NMR and fluorescence polarization
Sabutoclax (BI-97C1)	BCL-2 (0.32), BCL-X _L (0.31), MCL1 (0.20) and BCL2-A1 (0.62)	Structure-based design using ApoG2
TW37 (Gossipol analogue)	BCL-2 (0.29), BCL-X _L (1.11) and MCL1 (0.26)	Structure-based design using Gossipol
YC137	BCL-2 (6.43), BCL-X _L (2.21), BCL-B (3.1) and MCL1 (2.47)	Computer-based
Terphenyl-14	BCL-X _L (0.114)	α-helix-mimicking
MIM1	MCL1	High-throughput competitive screen (fluorescence polarization and displacement of FITC-MCL1 SAHB _A from MCL1ΔNΔC)
BIM SAHB _A	BCL-2 (0.0032), BCL-W (0.0027), MCL1 (0.0107) and BCL2-A1 (0.0014)	Stapled peptide derived from a BH3 domain

FITC, fluorescein isothiocyanate; IC₅₀, the concentration of a drug giving a 50% inhibition of the activity of a target enzyme; SAHB, stabilized α-helix of BCL-2 domains.

Table 1: Composés inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Juin *et al.*, 2013).

3.6.2. Inhibiteurs de l'expression protéique des membres anti-apoptotiques

Certains traitements entraînent indirectement une modification de l'expression des différents membres de la famille de Bcl-2. Ainsi, la dacarbazine est un agent alkylant qui empêche la réplication de l'ADN et bloque ainsi la prolifération cellulaire. Ce mécanisme d'action implique l'activation de la voie apoptotique de p53, qui est généralement intacte dans la plupart des mélanomes (Igney and Krammer, 2002; Vousden and Lane, 2007). L'activation de cette voie entraîne alors une diminution des protéines anti-apoptotiques et une augmentation des BOPs et protéines effectrices de l'apoptose, telles que Bim et Bax (Jiang *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2009). Ainsi, de nombreux médicaments peuvent directement réguler la famille de Bcl-2 afin de déclencher la voie apoptotique mitochondriale (Table 2). De nombreux agents qui endommagent l'ADN, telles que la cisplatine, affectent directement la voie mitochondriale de l'apoptose. Ils diminuent l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tout en augmentant celui des pro-apoptotiques, entraînant leur activation et la PMME (Shibuya *et al.*, 2003).

Le premier agent à cibler directement la protéine Bcl-2 à être testé cliniquement est l'oblimersen sodium (G3139, Genasense), oligonucléotide antisens de Bcl-2 qui cible l'ARNm de *Bcl-2* (Emi *et al.*, 2005). Par la suite, d'autres types de traitements qui régulent l'expression génétique des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été créés. Ainsi, le sodium butyrate, inhibiteur d'histone déacétylase, diminue la transcription du gène codant pour Bcl-xl dans les cellules mésothéliales, ce qui entraîne une diminution du taux de protéines Bcl-xl (Cao *et al.*, 2001). Un autre inhibiteur d'histone déacétylase, le depsipeptide, diminue l'expression protéique de Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1 dans les cellules de myélome (Khan *et al.*, 2004). Le flavopiridol, inhibiteur de kinase cycline-dépendante, réduit les niveaux de Mcl-1 dans les cellules cancéreuses du poumon (Rosato *et al.*, 2007). La spécificité pour les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 de ces traitements est moindre. Cependant, la capacité de ces agents à moduler les mécanismes de résistance aux traitements offre l'occasion de réaliser des combinaisons synergiques (Kang and Reynolds, 2009).

Chapitre 3 : La famille Bcl-2

Cellular target	Drug	BCL-2 family effect		Model	References
Anti-oxidant/anti-inflammatory? B-RAF	Vernolide-A	BAX	Upregulation	B16-F10	Pratheeshkumar and Kuttan (2011a)
		BCL-2	Downregulation	B16-F10	Pratheeshkumar and Kuttan (2011a)
	PLX-4720	BIM-EL	Upregulation	Mel-RMu (B-RAFV600E)	Jiang et al. (2010a)
DNA	Fotemustine	BIM-L	Upregulation	Mel-RMu (B-RAFV600E)	Jiang et al. (2010a)
		BIM-S	Upregulation	Mel-RMu (B-RAFV600E)	Jiang et al. (2010a)
		PUMA	Downregulation	1205Lu	Weber et al. (2009)
		Noxa	Upregulation	1205Lu	Weber et al. (2009)
	Cisplatin	BAX	Upregulation	G361	Shibuya et al. (2003)
		BCL-2	Downregulation	G361	Shibuya et al. (2003)
	Dacarbazine	BAX	Upregulation	A375	Jiang et al. (2010b)
		BCL-XL	Downregulation	FEMIX-1	Lillehammer et al. (2007)
		BCL-XL	Downregulation	A375	Jiang et al. (2010b)
		BIM	Upregulation	1205Lu	Weber et al. (2009)
ER stress	Thapsigargin	MCL-1	Downregulation	FEMIX-1	Lillehammer et al. (2007)
		MCL-1	Downregulation	A375	Jiang et al. (2010b)
		Noxa	Upregulation	451Lu, 1205Lu	Weber et al. (2009)
		BCL-2	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
	Tunicamycin	MCL-1	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
		Noxa	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
		PUMA	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
		BCL-2	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
		MCL-1	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
		Noxa	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
GST	Nemilini	PUMA	Upregulation	Mel-RM, MM200	Jiang et al. (2008)
		BAX	Upregulation	B16-F10	Pratheeshkumar et al. (2011)
Hydrogen disulfide donor	Diallyl trisulfide	BCL-2	Downregulation	B16-F10	Pratheeshkumar et al. (2011)
		BCL-XL	Downregulation	A375, M14	Zhou et al. (2009)
MAPK pathway	UO126	BAD	Upregulation	A375, M14	Zhou et al. (2009)
		BAD	Upregulation	Mel-RM	Wang et al. (2007)
		BIM-EL	Upregulation	Mel-RM, MM200	Wang et al. (2007)
		BIM-L	Upregulation	Mel-RM, MM200	Wang et al. (2007)
		BIM-S	Upregulation	Mel-RM, MM200	Wang et al. (2007)
		PUMA	Upregulation	Mel-RM, MM200	Wang et al. (2007)
Multiple targets	Phenoxodiol	BAD	Upregulation	IgR3, ME4405	Yu et al. (2006)
		BIM	Upregulation	IgR3, ME4405, MELAT, MELRM	Yu et al. (2006)
		Noxa	Upregulation	ME4405, MELAT	Yu et al. (2006)
		PUMA	Upregulation	ME4405, MELAT	Yu et al. (2006)
NFκB	Sulforaphane	BAX	Upregulation	B16-F10	Hamsa et al. (2011)
		BCL-2	Downregulation	B16-F10	Hamsa et al. (2011)
		BID	Downregulation	B16-F10	Hamsa et al. (2011)
NFκB and AP-1	Gambogic acid	BAX	Upregulation	A375	Xu et al. (2009)
		BCL-2	Downregulation	A375	Xu et al. (2009)
		BAX	Upregulation	B16-F10	Pratheeshkumar and Kuttan (2011b)
Oxidative stress	Dihydroartemisinin	BCL-2	Downregulation	B16-F10	Pratheeshkumar and Kuttan (2011b)
		Noxa	Upregulation	A375, G361	Cabello et al. (2011)
Peptidase	Elafin	PUMA	Upregulation	A375	Cabello et al. (2011)
		BAX	Upregulation	A2058	Yu et al. (2010)
Proteasome	MG-132	Noxa	Upregulation	A2058	Yu et al. (2010)
		PUMA	Upregulation	A2058	Yu et al. (2010)
		MCL-1	Upregulation	A375, WM852c	Miller et al. (2009)
	Bortezomib	Noxa	Upregulation	A375, WM852c	Miller et al. (2009)
		BID	Upregulation	MeWo	Seeger et al. (2010)
		MCL-1	Upregulation	MeWo	Seeger et al. (2010)
Transaminase	Aminooxyacetate	Noxa	Upregulation	MeWo	Seeger et al. (2010)
		PUMA	Upregulation	MeWo	Seeger et al. (2010)
		BCL-2	Downregulation	C8161, UACC3093	Qin et al. (2010)
		MCL-1	Downregulation	A375, C8161, UACC3039	Qin et al. (2010)
		Noxa	Upregulation	A375, C8161, UACC3039	Qin et al. (2010)

Table 2: Médicaments induisant des changements au niveau de la régulation de l'expression des membres de la famille de Bcl-2 au sein de mélanomes (Anvekar *et al.*, 2011).

Chapitre 4 : Etat de l'art sur p53 et la famille Bcl-2

Le suppresseur de tumeur p53 est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les membres de la famille de Bcl-2. En effet, l'expression de nombreuses protéines pro-apoptotiques, qui peuvent entraîner la voie intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose, est induite par p53 (Kang and Reynolds, 2009). A titre d'exemple, *Noxa* et *Puma* font partie de la panoplie de gènes apoptotiques que p53 peut activer (Michalak *et al.*, 2008).

L'apoptose indépendante de la transcription induite par p53 précède l'activation de ses gènes cibles (Erster *et al.*, 2004). Des études ont montré que le suppresseur de tumeur est capable de lier aussi bien des membres anti-apoptotiques que pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Sot *et al.*, 2007). Des interactions directes ont été observées pour au moins six membres de la famille de Bcl-2 : les membres anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl (Mihara *et al.*, 2003), Mcl-1 (Yao *et al.*, 2013) et Bcl-w (Lee *et al.*, 2014), ainsi que les membres pro-apoptotiques Bax (Chipuk *et al.*, 2004) et Bak (Leu *et al.*, 2004). La figure 17 illustre ces différentes interactions que nous allons détailler par la suite.

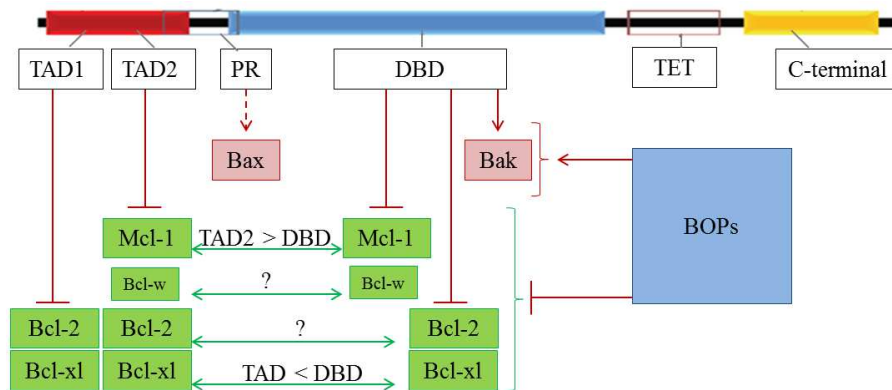


Figure 17 : Interactions entre les membres de la famille de Bcl-2 et le suppresseur de tumeur p53. Les différents domaines de la protéine p53 sont représentés sur la figure : les domaines de transactivation (TAD1 et TAD2), le domaine riche en proline (PR), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de tétramérisation (TET) et le domaine C-terminal. Les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques apparaissent dans des cadres rouges et verts respectivement. Le cadre de la protéine Bcl-w est représenté en plus petit, compte tenu du faible nombre de publications qui décrivent cette interaction. Les protéines BOPs sont représentées par le cadre bleu. Les lignes rouges continues (flèches et inhibitions) indiquent une interaction directe entre les protéines reliées. La flèche en pointillés indique une interaction fonctionnelle sans interaction physique démontrée. Les doubles flèches vertes indiquent, lorsqu'ils sont connus, l'ordre de préférence dans les affinités entre la protéine concernée et les domaines de p53.

4.1. Interaction avec les membres pro-apoptotiques

Les interactions entre p53 et les membres pro-apoptotiques
Bax et Bak permettent leur activation (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004). Ils induisent un changement de conformation qui favorise leur oligomérisation, requise pour leur fonction pro-apoptotique (Sot *et al.*, 2007). L'activation des membres pro-apoptotiques Bak et Bax joue un rôle central dans l'apoptose mitochondriale. L'accumulation cytosolique de p53 promeut l'activation indépendante de la transcription de Bax *in vivo*, suivant un modèle de «Hit-and-run» (Erster and Moll, 2005). Chipuk et son équipe ont travaillé avec des mutants p53. Ils ont utilisé une protéine p53 fusionnée au domaine de

Chapitre 4 : Etat de l'art sur p53 et la famille Bcl-2

liaison stéroïde du récepteur à œstrogène muté, qui ne s'active qu'en présence de tamoxifen (p53ER_{tam}). Ils ont aussi utilisé cette même protéine p53 dépourvue du domaine riche en proline (p53^{pp}ER_{tam}). La protéine p53^{pp}ER_{tam} est incapable d'entraîner l'apoptose des cellules MEF avec ou sans addition de tamoxifen, contrairement à p53ER_{tam}. Or l'apoptose indépendante de l'activité transcriptionnelle de p53 dans les cellules MEF est dépendante de Bax (et non de Bak). Incubée en présence de mitochondries purifiées et de la protéine Bax, p53ER_{tam} entraîne la libération de cytochrome c tandis que p53^{pp}ER_{tam} en est incapable. Dès lors, la fonction de p53ER_{tam} sur Bax implique le domaine riche en proline de p53 qui se trouve près du N-terminal (Chipuk *et al.*, 2004). L'interaction physique entre ces deux protéines n'a pu être établie par co-immunoprécipitation, bien que l'activation directe de Bax par p53 a été suggérée dans un système lipidique dépourvu de toute protéine excepté Bax et p53. Ceci démontre que l'activation de Bax est favorisée en présence de p53 mais n'implique pas nécessairement une interaction directe (Chipuk *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003).

La liaison de p53 à Bak, protéine intrinsèque de la membrane mitochondriale externe, catalyse l'activation de Bak et la libération de cytochrome c (Leu *et al.*, 2004). La caractérisation de la liaison p53-Bak révèle l'importance cruciale du domaine de liaison à l'ADN de p53 pour l'interaction et l'oligomérisation de Bak (Leu *et al.*, 2004; Pietsch *et al.*, 2007). Le DBD de p53 étant basique, il favorise l'interaction avec des domaines acides d'autres protéines, tels que le domaine BH4 des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Bax et Bak sont dépourvus de domaine BH4 (Moldoveanu *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2000), mais des mesures anisotropes indiquent pourtant une interaction électrostatique entre le DBD de p53 et Bak. Cependant, cette interaction est dix fois plus faible que celle de p53DBD avec Bcl-xl. La concentration d'ADN nécessaire à l'interruption de l'interaction entre p53 et Bak est plus grande que pour p53 et Bcl-xl. Ceci suggère que le site de liaison à l'ADN de p53 n'est pas complètement masqué par Bak, contrairement à Bcl-xl. Les résultats de résonance magnétique nucléaire confirment que Bak n'interagit pas avec l'ensemble du domaine de liaison à l'ADN, mais plutôt avec les acides aminés 202 à 208, ainsi que Val-173. Lorsque deux monomères de p53 s'assemblent pour lier l'ADN, les résidus

202, 208 et 173 sont masqués car ils se situent sur la surface d'interaction entre monomères. Ceci pourrait expliquer la compétition observée entre l'ADN et Bak pour le DBD de p53 : lorsque deux p53 interagissent avec l'ADN, les interactions inter-protéines qui stabilisent le dimère représentent un encombrement stérique qui compromet la liaison de Bak (Sot *et al.*, 2007). *In vitro*, p53 est incapable d'induire la PMME sur des mitochondries purifiées en absence de Bak (Leu *et al.*, 2004). En revanche, le rôle de TAD de p53 dans cette interaction est débattu et certaines publications soutiennent qu'il n'y a pas d'interaction à ce niveau (Leu *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003; Sot *et al.*, 2007).

4.2. Interaction avec les membres anti-apoptotiques

Outre ses interactions avec Bax et Bak, p53 peut aussi interagir avec les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. **Les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl** ont été les premières cibles moléculaires connues de p53 à la mitochondrie. Ces interactions, plusieurs fois vérifiées dans la littérature, inhibent l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et Bcl-xl (Ha *et al.*, 2013; Mihara *et al.*, 2003; Petros *et al.*, 2004; Sot *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2006). Étudié à un niveau cellulaire (Mihara *et al.*, 2003), le domaine de liaison à l'ADN a été suggéré comme étant le point d'ancrage pour Bcl-xl et Bcl-2 (Hagn *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Sot *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2006). Cependant, les travaux de Chipuk et son équipe indiquent que le domaine N-terminal de p53, comprenant TAD et PR, suffit à entraîner une apoptose indépendante de la transcription (Chipuk *et al.*, 2003). Le domaine de transactivation de p53 (p53TAD) comprend un sous-domaine TAD1 et un sous-domaine TAD2 possédant des activités indépendantes. L'équipe de Ha a démontré, par résonance magnétique nucléaire, que p53TAD1 et p53TAD2 peuvent lier les boucles hydrophobes formées par les domaines BH1, BH2 et BH3 des molécules Bcl-2 et Bcl-xl (Ha *et al.*, 2013).

Le membre anti-apoptotique Bcl-2 a été considérablement étudié dans le contexte du cancer. Il a notamment été décrit qu'il possède un domaine au sein d'une boucle flexible de régulation (BFR) entre les régions BH3 et BH4, correspondant aux acides aminés 32 à 87. Ce BFR peut subir des modifications post-traductionnelles au moyen de phosphorylations. La phosphorylation de ces sites augmente de façon significative la fonction anti-apoptotique de Bcl-2, avec un avantage cumulatif de la phosphorylation multi-site sur l'activation de Bcl-2 et sur la stabilité de son interaction avec Bax (Deng *et al.*, 2006). Le BFR de Bcl-2 comporte des sites de phosphorylation ainsi qu'un site de clivage par des caspases qui régulent sa fonction. Une délétion des acides aminés 32 à 80, qui préserve le site de phosphorylation S87, augmente la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 (Chang *et al.*, 1997). Des études plus poussées ont montré que le BFR possède deux régions fonctionnelles d'effets opposés: la région des acides aminés 69 à 87 (comprenant des sites de phosphorylation) favorise tandis que la région des acides aminés 32 à 68 (comprenant le site de liaison de p53, ainsi qu'un site de clivage par les caspases) inhibe l'activité pro-survie de Bcl-2. De fait, p53 lie Bcl-2 sur la région de régulation négative, liaison qui peut être évitée si Bcl-2 est phosphorylé en S70. La découverte de ces « Yin » et « Yang » des régions de régulation du BFR de Bcl-2 confirment la notion selon laquelle la liaison entre p53 et Bcl-2 constitue un processus dynamique de régulation « on-off ». Toutes ces données indiquent que la translocation de p53 vers la mitochondrie l'amène à interagir avec Bcl-2 et induire un changement de conformation qui expose le domaine BH3 et inactive Bcl-2 (Deng *et al.*, 2006). La liaison entre Bcl-2 et le DBD de p53 a été démontrée par GST pull-down (Lee *et al.*, 2014) et caractérisée de façon biophysique, en utilisant la résonance magnétique nucléaire (Lee *et al.*, 2014; Tomita *et al.*, 2006). Une surexpression de Bcl-2 supprime la voie apoptotique intrinsèque à la fois dépendante et indépendante de p53. Deng et son équipe ont démontré que, suite à un dommage de l'ADN, p53 peut lier Bcl-2 et cette liaison réduit l'association entre Bcl-2 et Bax : Bax peut alors promouvoir l'apoptose (Deng *et al.*, 2006).

Le membre anti-apoptotique Bcl-xl peut fixer p53 en deux domaines : le DBD et le TAD (Mihara *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2013). A ce jour, il n'a toujours pas été établi lequel des deux est le plus important sur le plan physiologique (Speidel, 2010). Il a été reporté que Bcl-xl peut fixer le TAD de p53, en particulier le premier sous-domaine TAD1, grâce à sa boucle de liaison BH3. Cette interaction a été démontrée par résonance magnétique nucléaire ainsi que par FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Xu *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2013). Les résidus de Bcl-xl impliqués dans cette interaction sont situés dans la région qui inclut $\alpha 4$, le N- et C-terminal de $\alpha 3$, le N-terminal de $\alpha 5$ et la partie centrale de $\alpha 2$. La plupart de ces résidus ne font pas partie de la boucle hydrophobe composée par BH1, BH2 et BH3 (Xu *et al.*, 2006). Néanmoins, d'autres articles stipulent que l'interaction entre Bcl-xl et le domaine TAD de p53 n'a pas lieu (Mihara *et al.*, 2003; Sot *et al.*, 2007). Il semblerait que la liaison de Bcl-xl avec le DBD de p53 soit une interaction plus forte que celle de Bcl-xl avec le TAD de p53 (Yao *et al.*, 2013). L'équipe de Matissek a utilisé des protéines fusionnées comprenant différents domaines individuels de p53 et la séquence d'adressage mitochondriale de Bcl-xl. Après s'être assurés que ces protéines fusionnées interagissaient avec Bcl-xl, il a été démontré que le domaine DBD seul est capable d'induire l'apoptose de manière plus efficace encore que p53 sauvage. Les chercheurs expliquent cette différence par le fait que le DBD dépourvu du TAD ne subit pas d'inhibition par MDM2, et ne participe pas non plus à la voie transcriptionnelle puisqu'il n'y a pas de site de tétramérisation (Matissek *et al.*, 2013). Des études de spectroscopie en résonance magnétique nucléaire ont montré que le site de liaison du DBD de p53 à Bcl-xl, interaction électrostatique, est constitué de la région négativement chargée suivante : C-terminal de l'hélice $\alpha 1$, N-terminal de la boucle entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, la boucle entre les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$, la boucle entre les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ ainsi que le N-terminal de l'hélice $\alpha 6$ de Bcl-xl (Hagn *et al.*, 2010; Petros *et al.*, 2004). Ainsi, l'interaction entre Bcl-xl et le TAD de p53 implique son domaine BH3, tandis que l'interaction avec le DBD de p53 monopolise un autre site de liaison au sein de la protéine anti-apoptotique (Xu *et al.*, 2006). Selon Sot et son équipe, l'interaction entre p53 et Bcl-xl est plus forte que celle de p53 avec Bak. Cependant, le site de liaison de Bcl-xl recouvre le DBD de p53 tandis que le site de liaison de Bak ne lie pas complètement ce domaine de

Chapitre 4 : Etat de l'art sur p53 et la famille Bcl-2

p53. De plus, la surface d'interaction de Bak n'est pas la même que le site d'interaction décrit pour Bcl-xl (Sot *et al.*, 2007). A concentrations égales de Bak et Bcl-xl, p53 va préférentiellement lier Bcl-xl en tant que dé-répresseur et l'interaction avec Bak en tant qu'activateur n'aura lieu qu'en deuxième étape, s'il y a excès de p53 (Sot *et al.*, 2007) ou si les BOPs libèrent p53 de Bcl-xl (Chipuk *et al.*, 2005). Le mécanisme physiologique proposé est que la liaison avec p53 entraîne un changement de conformation de la boucle BH3 de Bcl-xl, facilitant l'interaction entre Bcl-xl et les BOPs. Ceci déplace Bax et Bak de l'emprise des protéines anti-apoptotiques et ils peuvent alors promouvoir la PMME (Hagn *et al.*, 2010).

Le membre anti-apoptotique Mcl-1, principalement localisé à la membrane mitochondriale externe, séquestre le BOP pro-apoptotique Bim. En particulier, la liaison entre p53 et Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xl conduit à une augmentation de la concentration en Bim libre. Bim serait alors capable d'activer Bax et Bak (Han *et al.*, 2010). Ces résultats corroborent ceux qui avaient été avancés en 2004, selon lesquels certains événements semblent indispensables à la mort cellulaire par apoptose : la dégradation de Mcl-1 par le protéasome, l'inactivation de Bcl-xl, la déphosphorylation de Bim, la translocation de Bax et l'oligomérisation de Bax et/ou Bak (Jiang and Wang, 2004). Bien que Mcl-1 et Bcl-xl soient tous deux capables d'interagir directement avec p53, le site de liaison de Mcl-1 avec p53 est différent de celui de Bcl-xl. La faible affinité de Mcl-1 pour le domaine DBD du suppresseur de tumeur indique que cette interaction est peu probable dans les conditions physiologiques. En effet, Mcl-1 fixe le TAD de p53 avec plus d'affinité que Bcl-xl, ce qui suggère que le TAD, et non le DBD de p53, est le site physiologique de liaison de Mcl-1. De plus, au sein du TAD, Bcl-xl préfère se fixer sur le premier sous-domaine TAD1 tandis que Mcl-1 fixe préférentiellement le second sous-domaine TAD2. Les séquences TAD1 et TAD2 sont assez différentes en ce qui concerne les résidus polaires. Le site de liaison impliqué dans la protéine Mcl-1 comprend la boucle formée par les régions BH1, BH2 et BH3, avec le segment situé entre BH3 et BH1, y compris les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ et la boucle entre elles, ainsi que le C-terminal de l'hélice $\alpha 6$. Ceci suggère que p53 est probablement un compétiteur des BOPs pro-apoptotiques, permettant leur libération de Mcl-1 (Yao *et al.*, 2013). Il a notamment été démontré que le

suppresseur de tumeur permet la libération de Bak de la séquestration par Mcl-1 (Leu *et al.*, 2004). Cependant, la liaison entre Mcl-1 et le DBD de p53 a récemment été mise en évidence par GST pull-down et caractérisée par résonnance magnétique nucléaire (Lee *et al.*, 2014).

Le membre anti-apoptotique Bcl-w peut interagir avec le DBD de p53. Cette interaction a été observée par GST pull-down et résonnance magnétique nucléaire (Lee *et al.*, 2014). Toujours par résonnance magnétique nucléaire, il a aussi été démontré que la boucle hydrophobe composée de BH1, BH2 et BH3 de ce membre anti-apoptotique peut interagir avec le domaine TAD2 du suppresseur de tumeur (Ha *et al.*, 2013).

Les membres anti-apoptotiques, à l'exception de Bfl-1 et Bcl-B dont aucune étude n'a pu établir une interaction avec p53 à ce jour, sont donc capables d'interagir avec le suppresseur de tumeur p53 (Table 2). Des comparaisons structurales de ces complexes protéiques avec le domaine de liaison à l'ADN ont montré que le mécanisme de liaison du DBD de p53 est hautement conservé. Premièrement, les sites de liaison de Bcl-w, Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-xl se situent sur la surface positivement chargée du DBD. Deuxièmement, cette interaction induit un changement de conformation dans la poche de liaison BH3 des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, facilitant l'interaction avec les membres pro-apoptotiques de la même famille par un mode d'action allostérique (Hagn *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014). Cependant, l'ensemble de ces membres sont aussi capables d'interagir avec le domaine de transactivation du suppresseur de tumeur p53. Egalemt étudiée par résonnance magnétique nucléaire, l'interaction TAD de p53-membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 a été démontrée par Ha et son équipe, ce qui soutient l'étude de Chipuk indiquant que le domaine TAD seul est capable d'entraîner l'apoptose mitochondriale (Chipuk *et al.*, 2003; Ha *et al.*, 2013). La signification biologique de ces deux sites d'interaction possibles, le TAD et le DBD, n'est pas encore élucidée. Nous pouvons cependant supposer qu'il soit possible de réaliser des hétérotrimères. Ceux-ci seraient composés de p53 et de deux membres anti-apoptotiques, fixant chacun un site de liaison différent suivant leurs affinités respectives (Lee *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2013). Il est aussi possible que les deux sites, le DBD et le TAD, fixent simultanément un seul

Chapitre 4 : Etat de l'art sur p53 et la famille Bcl-2

membre anti-apoptotique : le premier fixerait la région acide du BH4 tandis que le second fixerait le site d'interaction des BOPs (Lee *et al.*, 2014).

Interaction	Bcl-2	Bcl-xl	Mcl-1	Bcl-w
p53 TAD1	RMN ¹	RMN ^{1,3}		
p53 TAD2	RMN ¹	RMN ¹	RMN ³	RMN ¹
p53 DBD	GST pull-down et RMN ^{4,6}	RMN ^{2,5,7}	GST pull-down et RMN ⁴	GST pull-down et RMN ⁴
Remarque	Affinité pour TAD2: Bcl-2 < Bcl-xl, Bcl-w ¹	Affinité DBD>TAD ³ Interaction avec TAD1 ou TAD2 comparables, mutuellement exclusifs ¹	Affinité TAD>DBD ³	

Table 1: Table des interactions entre les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et les différents domaines de p53.

Les expériences réalisées afin d'observer les interactions sont indiquées dans les cases en vis-à-vis des protéines et domaines protéiques concernés. Références: (1): (Ha *et al.*, 2013), (2): (Sot *et al.*, 2007), (3): (Yao *et al.*, 2013), (4) : (Lee *et al.*, 2014), (5) : (Petros *et al.*, 2004), (6) : (Tomita *et al.*, 2006), (7) : (Hagn *et al.*, 2010). RMN : Résonnance magnétique nucléaire.

OBJECTIFS

Objectifs

Objectifs

L'équilibre entre les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ainsi que leur activité définit le destin cellulaire dans les cellules normales aussi bien que dans les cellules cancéreuses. Cet équilibre est fréquemment perturbé dans le cancer, les membres anti-apoptotiques étant surexprimés dans de nombreux cancers humains. Dès lors, il est normal que la recherche se penche sur la compréhension des mécanismes cellulaires qui contrôlent la fonction de ses différents membres, la façon dont la cellule stressée enclenche l'apoptose, et de quelle façon la cellule cancéreuse résiste aux signaux pro-apoptotiques afin d'assurer sa survie.

D'autre part, il apparaît que le suppresseur de tumeur p53, bien qu'exprimé à l'état sauvage dans 50% des cancers humains, n'entraîne pas l'apoptose de ces cellules tumorales. Ceci implique une déficience dans les voies de signalisation du suppresseur de tumeur. L'importance de p53 d'une part et des membres de la famille de Bcl-2 d'autre part est capitale dans l'apoptose déclenchée par la voie mitochondriale. Dès lors, notre travail vise à déterminer de quelle façon les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 affectent le processus apoptotique dépendant du suppresseur de tumeur, en particulier son activité mitochondriale.

Le déséquilibre des membres anti-apoptotiques face aux membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 serait-il la cause de l'inefficacité de p53 ? La surexpression des membres anti-apoptotiques entraînerait-elle l'inhibition du suppresseur de tumeur ? De quelle façon les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourraient-ils entraver la fonction de p53 ? L'objectif de cette thèse est d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

Dans un premier temps, il est nécessaire d'établir les interactions qui peuvent avoir lieu entre les différents membres anti-apoptotiques d'une part et le suppresseur de tumeur p53 d'autre part. Certaines de ces interactions ont déjà été étudiées dans la littérature, allant jusqu'à définir les sites d'interaction entre les deux protéines en liaison. Notamment, les interactions entre p53 et Bcl-2, ou p53 et Bcl-xl ont été largement décrites (Chang *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2006; Hagn *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Mihara *et al.*, 2003; Petros *et al.*, 2004; Sot *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2013). Cependant, d'autres interactions n'ont été que peu, voire pas du tout étudiées. A notre connaissance aucune étude n'a été menée concernant la possible interaction entre le suppresseur de tumeur et Bfl-1 et très peu d'articles ont été publiés sur sa liaison avec Bcl-w (Ha *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014) ou Mcl-1 (Han *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2013). Notre premier objectif est dès lors d'étudier ces interactions protéiques.

Une fois les interactions entre p53 et les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 clairement établies, le second objectif est de déterminer si ces interactions entravent la translocation mitochondriale de p53 et l'apoptose sous-jacente. Pour cela, des lignées cellulaires qui surexpriment les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont soumises à différents stress. La comparaison du taux de survie des cellules indique le rôle d'entrave potentiel des différents membres anti-apoptotiques étudiés. Des cinétiques de translocation mitochondriale permettent l'analyse du rôle des membres anti-apoptotiques dans la relocalisation du suppresseur de tumeur en situation de stress.

Objectifs

L'étude des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et de la voie apoptotique mitochondriale au cours de cette thèse pourrait permettre de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à réactiver ou à augmenter l'activité de p53 sauvage dans la cellule cancéreuse.

Objectifs

RESULTATS

Chapitre 1

Chapitre 1 : Production de la protéine Mcl-1 et clones surexprimant Mcl-1

Chapitre 1

1.1. Introduction

Mcl-1 est le membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2 qui a la plus longue séquence. Il a été identifié en 1993 dans les cellules myéloïdes en différenciation. La protéine prototypique Mcl-1L comprend 350 acides aminés, correspondant à 37.4 kDa (Kozopas *et al.*, 1993). Mcl-1L comprend un domaine transmembranaire en C-terminal, ainsi que les domaines BH1, BH2 et BH3. Il existe une controverse en ce qui concerne la présence ou non du domaine BH4. En effet, suivant que l'on applique une définition plus ou moins stricte à celui-ci, il est considéré comme absent ou présent chez Mcl-1 (Green and Kroemer, 2005; Juin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 1995; Yip and Reed, 2008; Youle and Strasser, 2008). Sa région C-terminale possède une topologie similaire à celle des autres membres anti-apoptotiques et lie les BOPs sur la surface exposée de sa boucle hydrophobe. Son N-terminal (~150 résidus) est déstructuré et n'est pas indispensable à la liaison avec les BOPs (Day *et al.*, 2005). Des études *in vitro* ont montré que Mcl-1 lie Bim, Bid, Puma et Noxa mais ne lie pas les autres BOPs (Chen *et al.*, 2005).

L'expression de la protéine Mcl-1 est finement régulée par de nombreux mécanismes, aussi bien transcriptionnels que post-transcriptionnels et post-traductionnels (Juin *et al.*, 2013). Suite à un stimulus apoptotique, Mcl-1L est dégradé par le protéasome. Cette dégradation est nécessaire à la translocation mitochondriale de Bcl-xl et Bax, suivie de l'oligomérisation de Bax et Bak. L'oligomérisation de ces protéines permet la libération de cytochrome c et l'activation des caspases (Nijhawan *et al.*, 2003). Mcl-1L joue un rôle dans la survie des cellules malignes puisque sa délétion à l'aide d'oligodéoxynucléotides antisens entraîne l'apoptose des cellules cancéreuses (Derenne *et al.*, 2002). De plus, la surexpression de Mcl-1L dans des souris transgéniques entraîne la formation de nombreux lymphomes, ce qui démontre que Mcl-1 peut directement contribuer au développement de tumeurs (Zhou *et*

al., 2001). Le mécanisme moléculaire à travers lequel Mcl-1L promeut la survie n'est pas encore clairement établi. Cependant, il est probable qu'il empêche le relargage de cytochrome c depuis la mitochondrie, en formant des hétérodimères, afin de neutraliser des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 tels que Bim ou Bak (Cuconati *et al.*, 2003; Opferman *et al.*, 2005). En particulier, il a été démontré que Mcl-1 interagit et inhibe la protéine proapoptotique Bak (Leu *et al.*, 2004).

L'épissage alternatif du gène *Mcl-1*, ne tenant pas compte du second exon, entraîne la production d'un isoforme Mcl-1S/ Δ TM de 271 acides aminés, de 28.6 kDa, dépourvu de BH1 et BH2 ainsi que du domaine transmembranaire (Bae *et al.*, 2000; Bingle *et al.*, 2000). Bien que l'importance de cet isoforme n'ait pas encore été déterminée, la structure de Mcl-1S/ Δ TM est semblable à celle des BOPs (Gross *et al.*, 1999). Contrairement à Mcl-1L, la surexpression de Mcl-1S/ Δ TM entraîne la mort cellulaire (Michels *et al.*, 2005).

Les caspases, en particulier les caspases effectrices, sont aussi capables de cliver Mcl-1L à la suite de deux résidus aspartate (Asp¹²⁷ et Asp¹⁵⁷) (Snowden *et al.*, 2003). Le fragment C-terminal de 28 kDa ainsi généré constitue une protéine qui promeut fortement la mort cellulaire. Dès lors, le clivage de Mcl-1L par les caspases va non seulement priver la cellule d'une molécule de survie, mais va en plus entraîner l'apparition d'un puissant promoteur de mort cellulaire (Michels *et al.*, 2005).

Conformément aux objectifs fixés, la première étape est de produire les protéines p53 d'une part et les différents membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 d'autre part, afin de pouvoir éprouver leur interaction par GST pull-down. Ensuite, des clones qui surexpriment les différents membres pro-survie de la famille Bcl-2 seront réalisés pour tester l'effet de leur surexpression sur l'apoptose mitochondriale dépendante de p53. Ce chapitre a pour objet d'illustrer la façon dont ont été produits les différents plasmides et clones utilisés lors de cette thèse. Nous présenterons

Chapitre 1

ici en particulier l'exemple de la protéine Mcl-1L et des clones qui la surexpriment. Ce membre anti-apoptotique est mis en avant dans ce chapitre car, malgré tous les moyens mis en œuvre, nous ne sommes pas parvenus à purifier la protéine ni à obtenir un clone qui surexprime Mcl-1. Ce chapitre permet cependant de valoriser le travail réalisé.

1.2. Matériel et méthodes

Production de plasmides

Les séquences cDNA codant pour les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été amplifiées par PCR à partir des plasmides pCMV-Tag3, à l'aide de primers pourvus de queues flottantes. Dans le cas de pCMV-Tag3-Mcl-1, les primers sont pourvus des séquences de restriction correspondant à BamHI (Forward) et EcoRI (Reverse), désignés ainsi :

Forward: 5'-GAGA-GGATCC-AA-TTTGGCCTCAAAAGAAACGCGGT-3

Reverse : 5'-GCGC-GAATTC-CTATCTTATTAGATATGCCAAACCA-3

Le produit PCR a ensuite été cloné, à l'aide des enzymes de restriction indiqués, dans les plasmides pGEX-2T et pTRE2-pur-myc. Les produits de ligation ont été contrôlés afin de vérifier que la taille corresponde à la somme du plasmide et de l'insert cDNA. Les plasmides obtenus ont été transformés dans des bactéries *E. coli* TOP10, soumises à la pression de sélection. Les colonies résistantes ont été amplifiées, les plasmides isolés (suivant les instructions du kit « NucleoSpin Plasmid », Macherey-Nagel, REF n° 740588.50) et séquencés. Les colonies ayant produit le plasmide avec une séquence dépourvue de mutations, ou possédant de(s) mutation(s) silencieuse(s) ou mutation ponctuelle corrigée par mutagenèse dirigée ont été sélectionnés et amplifiés. Les plasmides ont alors été isolés et ajoutés à la collection de plasmides du laboratoire (-20°C).

Transformation de bactéries

200 ng de plasmides sont ajoutés aux bactéries incubées préalablement 10 minutes à température ambiante. Après agitation douce, le mélange est incubé 30 minutes sur glace puis soumis à un choc thermique : incubation de 45 secondes à 42°C dans un bain-marie. Suite à une incubation de 2 minutes sur glace, du milieu LB a été ajouté aux bactéries et la culture s'est poursuivie pendant 1 heure, sous agitation, dans un incubateur à 37°C. Le produit de la culture a ensuite été étalé sur des boîtes de Pétri pourvues de milieu LB solide et 100µg/ml d'ampicilline.

Production de protéines

Les protéines recombinantes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été produites à partir de *E. coli* BL21, comme décrit dans le chapitre 2, section « Materials and Methods » de cette thèse.

Electrophorèse en gel d'agarose

Un gel d'agarose à 1% est préparé à partir de tampon TBE (90 mM Tris, 85 mM Borate, 20 mM EDTA), aussi utilisé pour la cuve à électrophorèse. 12 µl d'ADN et 3 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol, glycérol et H₂O) sont mélangés pour chaque échantillon, qui migre de concert avec un marqueur de poids moléculaire (2-Log DNA Ladder 0.1-10.0 kb, New England BioLabs, N3200L). La migration se fait à 160 Volts, 360 mA, pendant 45 minutes. Le gel est ensuite incubé dans un bain de bromure d'éthidium pendant 30 minutes avant d'être révélé par un transilluminateur UV. Une photo est alors réalisée.

Transfection cellulaire

Les cellules à transfecter sont cultivées dans des boîtes rondes de 10 cm de diamètre jusqu'à atteindre une confluence de 50-70%. Dans un microtube de 1,5 ml, 10 µg de plasmides sont dilués dans 240 µl d'une solution de NaCl (150 mM) et le mélange est vortexé. Par boîte à transfecter, 20 µl de réactif de transfection (jetPEI[®] transfection reagent, Plyplus transfection TM, 101-10) sont mélangés avec 230 µl de la solution de NaCl. Le mélange est vortexé puis ajouté à la dilution d'ADN avant d'être immédiatement vortexé à nouveau. Le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante et enfin ajouté goutte à goutte aux différentes boîtes à transfecter. La sélection par antibiotique débute 24h plus tard.

Culture cellulaire

La culture cellulaire a été réalisée comme décrit dans le chapitre 2, section « Materials and Methods », de cette thèse.

Fractionnement cellulaire

L'isolation des fractions mitochondriale et cytosolique des cellules a été réalisé comme décrit dans le chapitre 2, section « Materials and Methods » de cette thèse.

Immunofluorescence

Les cellules à analyser sont cultivées dans des plaques 24 puits, pourvus de lamelles en verre stérile, à raison de 10.000 cellules par puits. A 60-70% de confluence maximum, les cellules sont rincées au PBS et fixées dans un tampon 4% Formaldéhyde-PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Après trois lavages au PBS, les cellules sont incubées pendant 15 minutes à

Chapitre 1

température ambiante avec le tampon 0,2% Triton X-100–PBS et à nouveau lavées trois fois au moyen de PBS. A l’abri de la lumière, les cellules sont incubées dans un tampon 3% BSA – 0,05% Tween20 – PBS (BTP) pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, chaque lamelle est incubée séparément, durant la nuit à 4°C, avec 50 µl de BTP supplémenté avec l’anticorps primaire (1/400 pour p53, 1/100 pour c-myc et 1/400 pour HSP60). Les cellules sont ensuite lavées trois fois au moyen du tampon 0.05% Tween20 - PBS (PBS-T) puis à nouveau incubées pendant 1 heure à 4°C avec 50 µl de BTP supplémenté avec l’anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (1/100). Après deux lavages au PBS-T, les lamelles sont épongées et déposées sur 5 µl de Vectashield + DAPI (9 :1) et observées au microscope à fluorescence.

Essai de formation de colonies

Les cellules Saos 2 à analyser sont cultivées dans des plaques 6 puits, à raison de 50.000 cellules par puits. Lorsque la culture atteint 60% de confluence, chaque plasmide pCMV-Tag3B est transfecté en triplicat. Le plasmide pCMV-Tag3B vide est utilisé comme contrôle négatif, et le plasmide pRC/CMV p53wt constitue le contrôle positif de suppression de croissance. L’antibiotique de sélection G418 (400 µg/ml) est ajouté dans le milieu 24h après la transfection puis la culture est maintenue pendant 15 jours. Lavées deux fois au PBS, les cellules sont fixées avec de l’éthanol 70% pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont alors rincées à l’eau puis incubées 15-20 minutes avec une solution de cristal violet (1,5 g de cristal, 100 ml d’éthanol 100%, le tout dilué 50 fois dans H₂O milliQ) avant d’être à nouveau abondamment rincées à l’eau. Une photo est alors réalisée.

1.3. Résultats

1.3.1. *Production du plasmide pGEX-2T-Mcl-1, nécessaire à la production de la protéine Mcl-1*

Pour produire et purifier la protéine Mcl-1, plusieurs étapes ont été réalisées. Le cDNA de la protéine a été obtenu et ligué dans un plasmide. Ensuite, des bactéries *E. coli* de la souche BL21 ont été transformées avec le plasmide produit. Enfin, la production protéique a été induite et la purification des protéines a eu lieu.

Nous avons choisi d'utiliser le vecteur d'expression procaryote pGEX-2T (Figure 1) afin de permettre la production de la protéine par des bactéries *E. coli* BL21. En effet, ce plasmide est doté de la séquence codante pour la GST (Glutathion-S-transférase) en amont du site multiple de clonage. Ce tag en N-terminal sera nécessaire à la purification de protéines produites, en mettant à profit la grande affinité du GST envers le glutathion. Un site de clivage par la thrombine est présent entre la fin de la séquence de la GST et le début du site multiple de clonage. Il est donc possible de cliver le tag GST de la protéine en fin de purification. Le gène de résistance à l'ampicilline du plasmide pGEX-2T permet la sélection des bactéries qui ont efficacement intégré le plasmide.

Notre laboratoire possède le cDNA de Mcl-1L humain cloné dans le plasmide pCMV-Tag3B. Ce plasmide, ainsi que les plasmides équivalents codant pour Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w et Bfl-1, sont le fruit du travail de mémoire de Catherine Staudt (Catherine Staudt, 2010). Le cDNA de Mcl-1 a été amplifié par PCR et la taille du produit PCR a été contrôlée par migration sur gel d'agarose. Le cDNA amplifié a ensuite été restreint avec les enzymes de restrictions préalablement choisis, puis ligué avec le plasmide pGEX-2T restreint avec les mêmes enzymes. Les produits de ligation ont été transformés et amplifiés dans des bactéries *E. coli* Top10 chimiocompétentes. Les plasmides purifiés ont ensuite à nouveau été contrôlés par restriction. Les plasmides dont la taille de l'insert correspond à la taille attendue du cDNA ont été séquencés. Le plasmide sélectionné sera celui dont la séquence cDNA ne comprend pas de mutation, ou bien des mutations silencieuses ou encore des mutations ponctuelles que l'on peut

Chapitre 1

corriger aisément par une mutagenèse dirigée. Dans le cas de Mcl-1, nous avons retenu le plasmide codant pour le cDNA de Mcl-1 pourvu de deux mutations silencieuses.

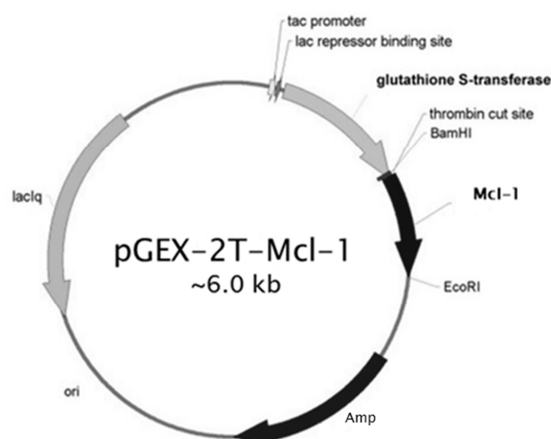


Figure 1: Plasmide pGEX-2T-Mcl-1. Le plasmide pGEX-2T comporte 4.948 pb comprenant la séquence codante pour la GST (Glutathione S-transférase) en amont du site de restriction par la thrombine (thrombine cut site), suivi du site multiple de clonage. Le gène codant pour la protéine Mcl-1 (1053 pb) est inséré ici entre les sites de restriction BamHI et EcoRI. Le vecteur comporte aussi le gène de résistance à l'ampicilline (Amp).

1.3.2. Production de la protéine Mcl-1

La production de la protéine Mcl-1 a été entreprise dans le but de l'engager dans un GST pull-down en présence de p53. Le principe du test est de mettre en évidence une interaction entre une protéine tagguée (GST-Mcl-1) et une autre protéine sans tag (p53). Grâce au tag GST, il est possible d'immobiliser la protéine Mcl-1 sur des billes de glutathion-sépharose, puisque la GST a une grande affinité pour ce tripeptide. En incubant GST-Mcl-1 en présence de p53, il est possible d'éprouver la capacité des deux protéines à interagir. Ensuite, l'ajout de billes de glutathion-sépharose suivi d'une centrifugation permettra de sédimenter les éventuels complexes. Lors d'une analyse par Western blot, on pourra détecter la présence de GST-Mcl-1 ainsi que, s'il y a eu interaction, celle de p53 (Figure 2).

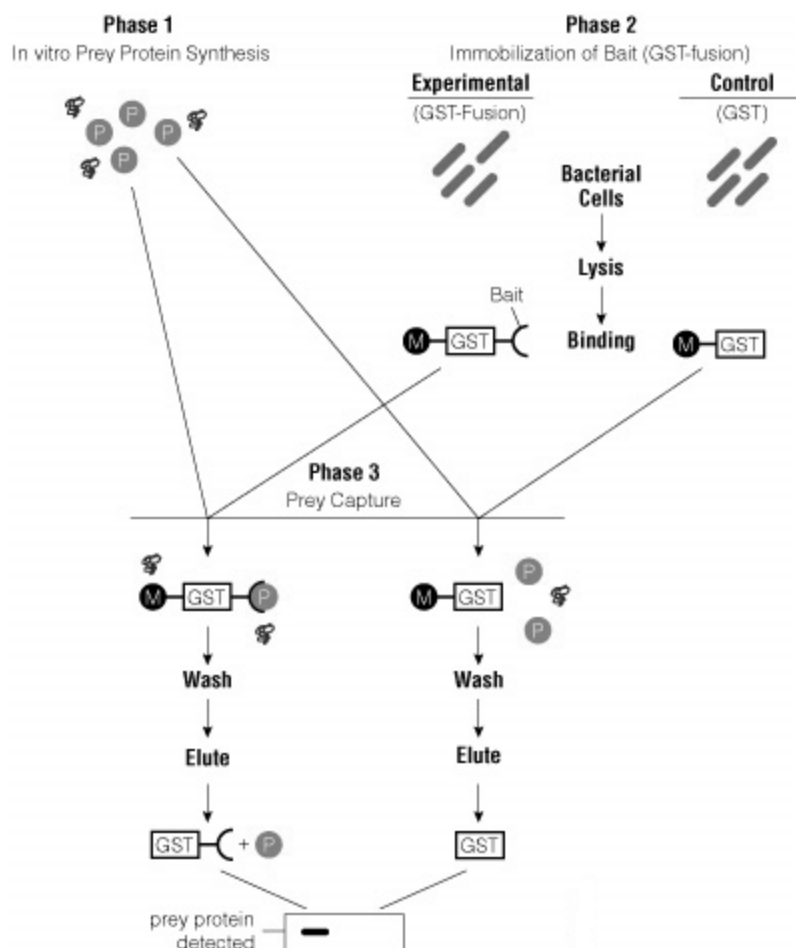


Figure 2: Schéma du protocole de GST pull-down. En phase 1, la protéine non tagguée est synthétisée *in vitro*. En phase 2, la protéine pourvue du tag GST et la GST seule (contrôle) sont purifiées à partir d'une culture de bactéries. Ces deux protéines sont mises en présence des billes de glutathion-sépharose (billes notées M sur la figure). En phase 3, les protéines liées aux billes sont mises en présence de la protéine non tagguée. Après lavage et élution (ou centrifugation), l'éluat (ou le culot) est analysé par Western blot. La présence de la protéine non tagguée révèle une interaction spécifique à condition que cette protéine n'interagisse pas avec la GST seule (contrôle).

Chapitre 1

Pour obtenir la protéine GST-Mcl-1, nous avons transformé des bactéries *E. coli* BL21 avec le plasmide pGEX-2T-Mcl-1. La souche BL21 est couramment utilisée pour l'expression de protéines recombinantes. En effet, rendue compétente de façon chimique, cette souche est dépourvue des protéases *Ion* et *ompT* (Outer Membrane Protease). L'absence de ces protéases préserve les protéines à produire : elles ne sont ni dégradées au sein de la bactérie (*ion*), ni dans le milieu de culture (*ompT*). De plus, cette souche est aussi dépourvue de glutathion réductase et de thiorédoxine réductase (Bessette *et al.*, 1999). Le répresseur protéique lacIq exprimé constitutivement inhibe l'expression de la protéine d'intérêt en absence d'induction. Lorsque la culture bactérienne atteint la densité requise, l'expression de la protéine recombinante est induite au moyen d'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside). Les protéines produites sont alors purifiées par chromatographie d'affinité avec des billes de glutathion-sépharose. Par élution avec du glutathion réduit ou bien par clivage du site de restriction de la thrombine, la protéine purifiée est récupérée avec ou sans le tag GST. Le produit de cette purification est chargé dans un gel d'électrophorèse, en parallèle avec des doses connues et croissantes de BSA, de façon à estimer la concentration en protéines purifiées obtenues. Ce gel permet également de contrôler la taille de la protéine par rapport à la taille attendue, ainsi que sa pureté.

Les résultats obtenus lors de cette purification de Mcl-1 sont inattendus (Figure 3A et 3B). Suite à une purification protéique sans clivage par la thrombine, la taille prévue de 37.4 kDa de Mcl-1 à laquelle s'ajoute la taille du tag GST de 26 kDa correspond à un total de 63.4 kDa. Or, le produit de purification indique trois bandes de concentration différentes : la bande la plus importante indique une taille de ~38 kDa, tandis que deux bandes de concentration beaucoup plus faibles indiquent des tailles de ~80 et ~65 kDa (Figure 3A). Il est possible que la bande de ~65 kDa corresponde à celle du Mcl-1L pourvue du tag GST.

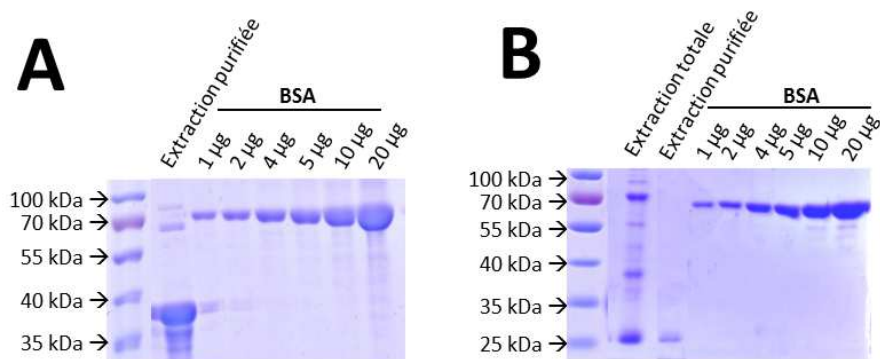


Figure 3: Gels de purification de la protéine GST-Mcl-1 produite par *E. coli* BL21 transformées par pGEX-2T-Mcl-1, clivée (B) ou non (A) par la thrombine. La première bande correspond au marqueur de poids moléculaire. Les six dernières bandes permettent d'établir une droite étalon BSA.

Une nouvelle purification de la protéine a été réalisée, en utilisant la thrombine de sorte à cliver le tag GST. A nouveau, le résultat obtenu est inattendu (Figure 3B) : la protéine purifiée affiche une taille de ~28 kDa au lieu des 37.4 kDa escomptés. Il est envisageable que cette bande corresponde à la GST seule, compte tenu de sa taille (26 kDa). Néanmoins, les protéines obtenues sont issues d'un éluat et la GST dispose d'une haute affinité pour les billes de glutathion-sépharose.

Le clivage par la thrombine n'ayant entraîné l'apparition que d'une unique bande de taille inattendue, une nouvelle production et purification de Mcl-1 a été réalisée. Cette fois, pour que le tag GST soit maintenu, le clivage par la thrombine n'est pas utilisé. Afin de pouvoir concentrer la protéine de ~65 kDa (vraisemblablement celle qui correspond à Mcl-1 pourvu du tag GST), un filtre de 50 kDa est utilisé. Ce filtre permet de retenir et de récupérer les protéines qui ont un poids moléculaire supérieur à 50 kDa, les molécules plus petites étant éliminées. Malgré cette précaution, le résultat de la purification protéique est sensiblement le même que celui obtenu à la figure 3A. L'efficacité du filtre n'est pas mise en doute, puisqu'il s'est avéré efficace lors de la purification des protéines Bcl-xl, Bcl-w et Bfl-1. L'hypothèse posée est dès lors la suivante : les trois bandes de la figure 3A seraient issues d'un complexe protéique comprenant Mcl-1 formé par liaison covalente ou non covalente. Ces interactions

Chapitre 1

permettraient à la protéine contaminante de ~38 kDa d'être retenue lors de la filtration.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons considérer dans un premier temps qu'il s'agit d'un complexe protéique formé par liaison non covalente. Afin de rompre ces liaisons, différentes concentrations en SDS (dodécylsulfate de sodium) seront testées. Le SDS est un détergent qui agit en perturbant les liaisons non covalentes entre protéines, les dénaturant et provoquant la perte de leur conformation native. L'idée ici est de déterminer la concentration nécessaire en SDS pour perturber d'éventuelles liaisons non-covalentes, tout en restant en deçà du seuil de la dénaturation de la protéine d'intérêt. Des études semblables ont déjà été réalisées, associant les effets d'une élévation de la température et d'une concentration croissante en SDS (Carvalho *et al.*, 2013). Les lavages successifs avec 0, 0.2, 0.5 et 1% de SDS indiquent qu'il faut au minimum 0,5% de SDS pour commencer à éliminer les protéines indésirables mais cette concentration élimine aussi la protéine d'intérêt Mcl-1 (Figure 4A).

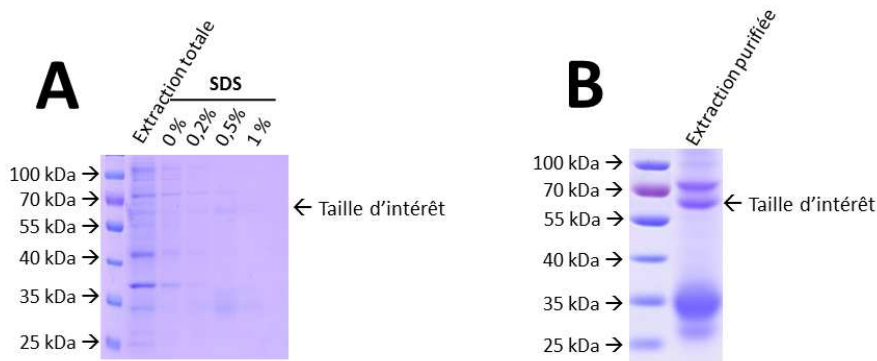


Figure 4: (A) L'extraction protéique totale suite à l'induction de la production de Mcl-1 est lavée avec différentes concentrations en SDS puis chargée dans le gel SDS-PAGE. (B) Le produit de la purification protéique de Mcl-1 est dénaturé dans un tampon de Laemmli sans DTT. Le tout est ensuite chargé dans un gel d'agarose.

Une autre possibilité serait que le complexe protéique est formé par des liaisons covalentes disulfures. Le DTT (Dithiothreitol) présent dans le tampon de Laemmli est utilisé pour réduire les

liaisons disulfures intramoléculaires et intermoléculaires. Dès lors, si le produit de purification protéique est dénaturé dans un tampon de Laemmli dépourvu de DTT, l'électrophorèse sur gel d'agarose devrait entraîner l'apparition d'une bande protéique unique, celle du complexe protéique, dont la masse apparente correspondrait à la somme des trois bandes observées. Afin d'éprouver cette hypothèse, une nouvelle purification de Mcl-1 est réalisée. Ici encore, le tag GST est maintenu (pas de clivage par la thrombine). Le produit de purification est dénaturé dans un tampon de Laemmli sans DTT puis le produit de purification subit une électrophorèse par migration en gel d'agarose (Figure 4B). L'apparition des trois mêmes bandes suite à cette électrophorèse indique qu'il ne s'agit pas non plus d'un complexe protéique impliquant des ponts disulfures.

1.3.3. Production de clones surexprimant Mcl-1

Le second objectif de cette thèse est de déterminer de quelle façon les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 interfèrent dans la translocation mitochondriale de p53 et l'apoptose sous-jacente. Pour cela, nous avons choisi de créer des clones qui surexpriment les différents membres anti-apoptotiques de cette famille. Dans un premier temps, nous avons créé des clones à partir des cellules d'ostéosarcome humain Saos 2 (p53^{-/-}) afin de pouvoir contrôler la présence ou non du suppresseur de tumeur au sein de la cellule (transfection transitoire de p53). Dans un second temps, nous avons choisi de travailler sur des cellules d'ostéosarcome humain U2OS (p53wt) pourvues d'un système Tet-On, afin de pouvoir contrôler la surexpression des différents membres anti-apoptotiques.

Afin de produire des clones qui surexpriment la protéine Mcl-1L, nous utilisons un vecteur d'expression eucaryote. Ce vecteur possède la séquence codante du cDNA de Mcl-1 ainsi qu'un gène de résistance à l'antibiotique G418, de manière à pouvoir générer des lignées ou clones stables. Après transfection, les clones sélectionnés sont ceux qui survivent à l'antibiotique de sélection et qui expriment de façon importante la protéine d'intérêt.

Notre laboratoire possède le plasmide pCMV-Tag3B-Mcl-1, ainsi que les plasmides vide ou codants pour Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w et Bfl-1 (Catherine Staudt, 2010). Les protéines exprimées portent un tag

Chapitre 1

c-myc N-terminal. L'expression des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 a été contrôlée par Western blot dans les différents clones Saos 2 (Figure 5A) et nous avons retenu ceux dont l'expression de la protéine d'intérêt était importante. La localisation subcellulaire des membres anti-apoptotiques surexprimés a été vérifiée par fractionnement cellulaire des clones sélectionnés (Figure 5B). L'expression et la localisation de ces membres ont aussi été vérifiées par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre le tag c-myc (figure 6).

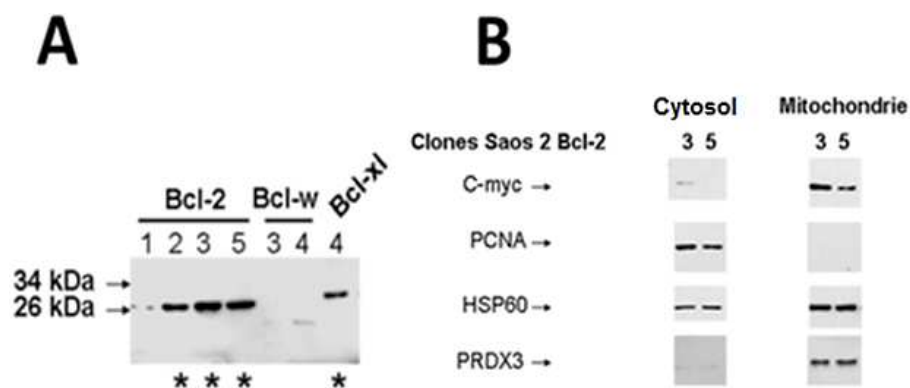


Figure 5 : (A) Caractérisation des clones Saos 2 par Western blot. Les clones pCMV-Tag-3-Bcl-w n°3 et 4 expriment peu ou pas la protéine Bcl-w taguée. Les clones pCMV-Tag-3-Bcl-2 n° 2, 3 et 5 ainsi que le clone pCMV-Tag-3-Bcl-xl n°4 expriment à des niveaux importants et comparables la protéine attendue. La taille des protéines attendues sont les suivantes : 26 kDa pour Bcl-2, 21 kDa pour Bcl-w et 30 kDa pour Bcl-xl. (B) Fractionnement cellulaire et analyse par Western blot des clones Saos 2 pCMV-Tag-3-Bcl-2 n°3 et 5. L'anticorps dirigé contre le tag c-myc révèle la localisation mitochondriale de la protéine Bcl-2. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) est une protéine nucléaire et cytoplasmique. HSP60 (Heat-Shock Protein 60) est mitochondriale et dans une moindre mesure cytoplasmique. PRDX3 (Peroxisredoxin-3) est une protéine exclusivement mitochondriale.

L'analyse par western blot (immunodétection du tag c-myc) a mis en évidence des clones Saos 2 qui surexpriment les protéines Bcl-2 et Bcl-xl. La surexpression de la protéine Bcl-w dans le clone Saos 2 n°4 n'est pas assez importante que pour être retenu. En ce qui concerne les autres constructions, aucun clone exprimant Mcl-1 ou

Bfl-1 n'a pu être obtenu. Seuls les clones qui surexpriment Bcl-2 ont été exploités par la suite, dans le cadre d'immunoprécipitations.

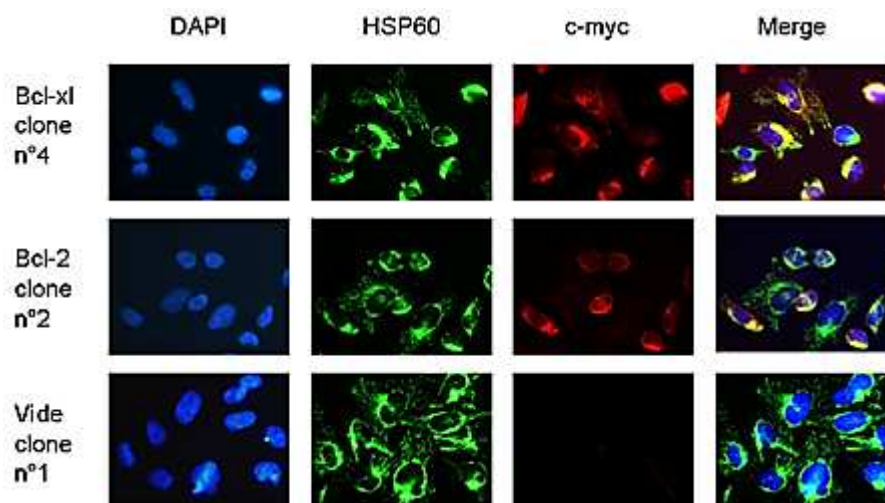


Figure 6 : Analyse par microscopie à fluorescence des clones Saos 2. Les cellules Saos 2 ont été transfectées de manière stable avec le plasmide pCMV-Tag-3 vide ou codant pour la protéine Bcl-xl ou Bcl-2. Le noyau est marqué au DAPI, les mitochondries sont détectées à l'aide d'un anticorps anti-HSP60 (Santa Cruz Biotechnology), et la localisation de Bcl-xl et Bcl-2 est réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le tag c-myc (Santa Cruz Biotechnology). Les trois marquages ont été superposés afin d'observer la co-localisation du tag c-myc avec les mitochondries.

Des essais de formation de colonies ont été réalisés afin d'investiguer sur la difficulté à obtenir des clones exprimant Mcl-1, Bfl-1 et Bcl-w (Figure 7). La technique utilise la même lignée Saos 2 p53^{-/-}, transfectée de façon transitoire avec les différents vecteurs d'expression. Les cellules sont ensuite soumises à une pression de sélection au moyen de l'antibiotique G418 pendant deux semaines. A la fin de l'expérience, le nombre de colonies dans chaque condition est évalué. La technique nécessite deux contrôles. Le premier consiste en la transfection du vecteur vide pCMV-Tag3, condition expérimentale où le plus grand nombre de colonies sera observé. D'autre part, la transfection d'un plasmide codant pour p53 wt constitue le contrôle

Chapitre 1

positif de suppression de croissance, compte tenu de ses fonctions d'inhibiteur du cycle cellulaire et d'inducteur de l'apoptose.

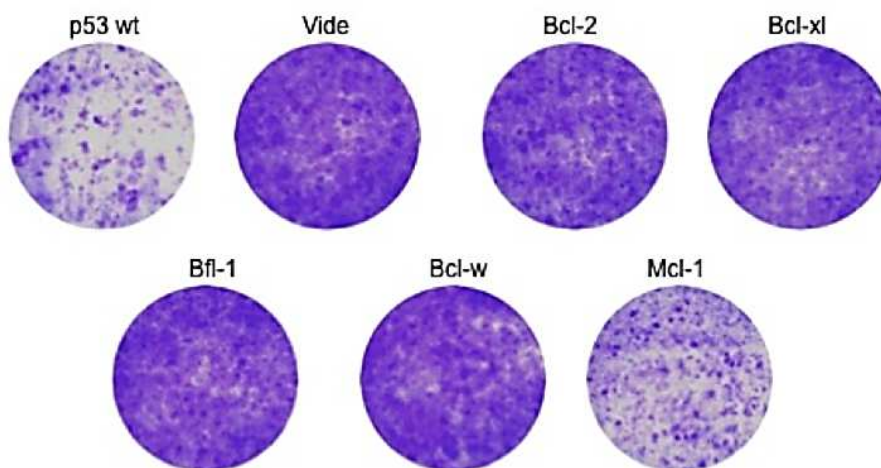


Figure 7 : Détermination de l'activité de suppression de la croissance des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (essais de formation de colonies). Des cellules Saos 2 ont été repiquées à faible densité et ensuite transfectées au moyen des vecteurs PRC/CMV-p53wt (contrôle positif), pCMV-Tag3 vide (contrôle négatif) ou codant pour les protéines Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1 et Bcl-w. Après 24h, le processus de sélection a débuté en présence de 400 µg/ml de G418. Après 14 jours, les colonies ont été fixées et colorées au cristal violet. La figure présente un puits représentatif pour chacune des constructions transfectées.

Le nombre de colonies formées suite à la transfection des plasmides pCMV-Tag3-Bcl-2, -Bcl-xl, -Bfl-1 et Bcl-w est comparable à celui des cellules transfectées au moyen du plasmide vide (Figure 7). La quantité de colonies présentes dans les puits transfectés au moyen de pCMV-Tag3-Mcl-1 est comparable à celle du contrôle positif de suppression de croissance pRC/CMV-p53wt. Afin de vérifier que la surexpression des protéines a bien lieu suite à la transfection transitoire, une analyse Western blot a été réalisée (Figure 8). Ces résultats suggèrent que la surexpression de Mcl-1, bien que faible,

résulte en une inhibition de la croissance. Cela peut expliquer la difficulté d'obtenir des clones Saos 2 stables surexprimant la protéine. Par contre, Bfl-1 et Bcl-w n'ont pas pu être détectés lors de cette analyse par Western blot. On ne peut donc pas émettre une hypothèse. Notons cependant que les différents plasmides pCMV-Tag3 codant pour les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 ont prouvé leur fonctionnalité, notamment lors de transfections transitoires dans la lignée CHO (détection par immunofluorescence) et la lignée PA1 (analyse Western blot) (Catherine Staudt, 2010).

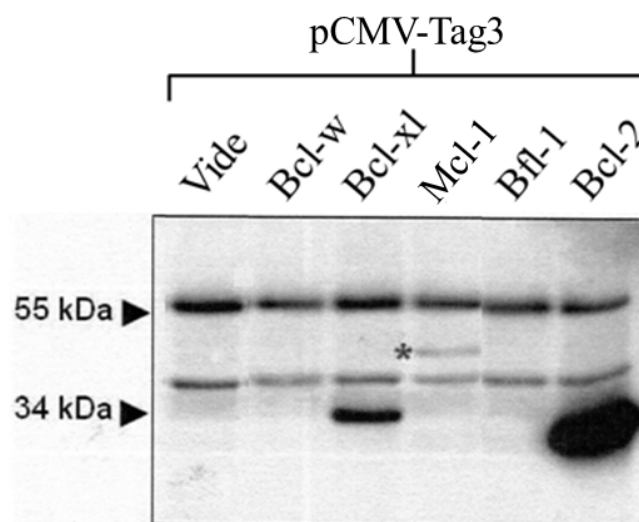


Figure 8 : Analyse de l'expression de protéines suite à la transfection transitoire de plasmides dans les cellules Saos 2. Des cellules Saos 2 ont été transfectées pendant 24h avec les plasmides suivants : pCMV-Tag3 (vecteur vide), pCMV-Tag3-Bcl-w, -Bcl-xl, -Mcl-1, -Bfl-1 et -Bcl-2. Le tag c-myc N-terminal ajouté aux protéines dont les séquences cDNA ont été clonées dans le plasmide pCMV-Tag3 a été détecté par un anticorps monoclonal de souris (anti-c-myc 9E10, Santa Cruz Biotechnology, sc-40). L'anticorps marque également le c-myc endogène de la cellule, notamment c-myc2 (~59 kDa) et c-mycS (~40 kDa). L'expression de Bcl-xl (~26 kDa), de Mcl-1 (~38 kDa *) et de Bcl-2 (~26 kDa) a été détectée (Catherine Staudt, 2010).

A la lumière de ces indications, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une surexpression induite de Mcl-1 permettrait de contourner la difficulté à obtenir des clones stables. Dès lors, nous

Chapitre 1

nous sommes tournés vers les cellules U2OS Tet-On, lignée cellulaire issue d'un ostéosarcome humain, pourvue du système Tet-On.

Le système Tet-On met en jeu deux plasmides, un plasmide régulateur et un plasmide de réponse. Le plasmide régulateur pUHD17-1neo octroie la résistance à l'antibiotique G418 et possède une région codant pour la protéine régulatrice rtTA (reverse tetracycline controlled transactivator). Le plasmide de réponse pTRE2-pur-myc possède la séquence codant pour la protéine d'intérêt ainsi que le gène de résistance à l'antibiotique puromycine. En présence de rtTA et de doxycycline, antibiotique d'induction protéique, la transcription du gène d'intérêt peut avoir lieu.

Afin de pouvoir utiliser ces cellules, des plasmides pTRE2pur-myc codant pour les différents membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 ont été réalisés. De nouveaux primers ont donc été conçus, afin de pouvoir amplifier les cDNA présents dans les plasmides pCMV-Tag3B. Les mêmes contrôles réalisés pour la production de plasmide pGEX-2T sont appliqués ici : contrôle des produits PCR par migration en gel d'agarose, restrictions et séquençage des plasmides sélectionnés.

Les cellules U2OS Tet-On ont été transfectées avec les différents plasmides pTRE2pur-myc. Les clones sélectionnés sont ceux qui produisent un taux important de protéine en présence de doxycycline et dont la production protéique est nulle ou très faible en absence d'induction. L'inductibilité de l'expression protéique a permis ici l'obtention de clones surexprimant les protéines Bcl-2, Bfl-1 et Bcl-w. Les cellules transfectées avec le plasmide pTRE2pur-myc-Mcl-1 ne prolifèrent pas ou très peu, rendant impossible la production de clones exprimant de manière inductible la protéine Mcl-1.

1.4. Discussion

La production de protéines est dépendante d'un vecteur et d'un système d'expression. En fonction de la protéine et de sa localisation cellulaire, sa purification sera plus ou moins aisée. Dans le cas présent, nous avons choisi le plasmide pGEX-2T : le clonage du cDNA de Mcl-1 dans ce plasmide a été réalisé avec succès. Le tag GST introduit en N-terminal permet une purification de la protéine par affinité avec le glutathion. Des bactéries *E. coli* BL21 ont été efficacement transformées par le plasmide, comme l'indique la résistance à l'antibiotique ampicilline. La production de la protéine Mcl-1 a été induite. Cependant, sa purification n'a pu être menée à bien. Le domaine transmembranaire en C-terminal de Mcl-1 a peut-être été l'une des causes qui a rendu sa purification impossible.

L'apparition de trois bandes protéiques dans le gel de purification de Mcl-1 a soulevé un grand nombre de questions. Les tailles obtenues (38, 65 et 80 kDa) correspondaient à la protéine attendue (~65 kDa) ainsi qu'à deux autres protéines parasites dont une, très abondante, de 38 kDa. Ces protéines bactériennes ont été purifiées soit grâce à leur affinité pour le glutathion, soit à leur affinité pour GST-Mcl-1. Etant donné que la purification d'autres protéines telles que Bcl-xl, Bfl-1 et Bcl-w n'a pas entraîné l'apparition de ces deux protéines contaminantes, il est peu probable que ces protéines bactériennes aient été purifiées suite à leur affinité pour le glutathion. C'est donc l'affinité pour la protéine GST-Mcl-1 qui serait en cause.

Le maintien de la protéine parasite de 38 kDa suite à une filtration à 50 kDa suggère une interaction protéique avec GST-Mcl-1, ce qui permet au complexe d'être retenu par le filtre, l'interaction entre cette protéine et les protéines bactériennes pouvant être covalente ou non. Le SDS a été utilisé afin de rompre d'éventuelles liaisons non covalentes, mais la concentration nécessaire en SDS entraîne également la perte de la protéine d'intérêt GST-Mcl-1. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'une liaison covalente. Pour tester cette hypothèse, le produit de purification protéique a subi une électrophorèse en absence de DTT : l'apparition des trois bandes protéiques, à la place d'une seule bande correspondant au complexe protéique, rend l'hypothèse caduque.

Chapitre 1

La production et purification de Mcl-1 a déjà été décrite dans la littérature (Czabotar *et al.*, 2007; Day *et al.*, 2008; Nijhawan *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Cependant, la protéine Mcl-1 obtenue est souvent tronquée au niveau du domaine N-terminal ainsi que du domaine transmembranaire (Day *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). Des protéines Mcl-1 chimériques sont aussi utilisées (Czabotar *et al.*, 2007). Le but de la production de Mcl-1 ici étant d'étudier son interaction possible avec le suppresseur p53, aucune de ces deux solutions n'est acceptable. En effet, travailler avec une protéine tronquée ou chimérique pourrait entraîner des résultats contestables. Ainsi, l'absence d'interaction pourrait s'expliquer par le fait que le site d'interaction est absent sur la protéine tronquée. L'observation d'une interaction pourrait quant à elle être due à l'apparition d'un nouveau site d'interaction sur la protéine chimérique. La seule étude utilisant la protéine Mcl-1L humaine complète est celle de Nijhawan et son équipe: deux étapes supplémentaires de purification, une chromatographie à échange d'ions suivie d'une chromatographie d'exclusion, ont été nécessaires à l'obtention de la protéine purifiée (Nijhawan *et al.*, 2003). Un autre article indique une purification de GST-Mcl-1 mais la pureté de la protéine obtenue, concentrée avec un filtre à 10 kDa, n'est pas indiquée dans la publication (Han *et al.*, 2005). Il serait judicieux de mettre à profit les interactions fortes connues entre Mcl-1 d'une part et Noxa ou Puma d'autre part (Rautureau *et al.*, 2010a) afin de permettre la purification de Mcl-1. Une autre façon de contourner les difficultés rencontrées dans la purification protéique à partir de bactéries serait la production de la protéine par traduction *in vitro*, en réalisant au préalable un plasmide pourvu du promoteur T7 et possédant la séquence cDNA de Mcl-1.

Pour créer des clones cellulaires stables, nous avons utilisé un vecteur d'expression eucaryote doté d'un gène de résistance à l'antibiotique G418, permettant la sélection des cellules qui l'auront efficacement intégré. Nous n'avons pu obtenir de clone Saos 2 qui sur-exprime de façon stable la protéine Mcl-1, à partir du plasmide pCMV-Tag3-Mcl-1. L'efficacité de la transfection n'est pas en cause puisque nous avons réussi à obtenir des clones Saos 2 qui sur-expriment de façon stable Bcl-2 et Bcl-xl. L'essai de formation de colonies suggère que la surexpression de Mcl-1 entraîne une inhibition de la croissance, ce qui rejoint l'étude de Fujise et son équipe (Fujise

et al., 2000). Cet article décrit que Mcl-1 interagit directement avec PCNA, inhibant la progression du cycle cellulaire. Une autre explication possible serait que Mcl-1L serait clivé par les caspases effectrices, générant ainsi une protéine pro-apoptotique qui compromet fortement la croissance cellulaire. Cette hypothèse implique que la surexpression de Mcl-1 entraîne l'activation des caspases effectrices. La forme clivée de Mcl-1 (28 kDa), dépourvue de la partie N-terminale de la protéine, ne peut être observée dans nos analyses par Western Blot puisque le tag c-myc est supprimé.

La production de clones stables U2OS inductibles (Tet-On) a alors été entreprise, l'inductibilité de l'expression de Mcl-1 pouvant contourner l'inhibition de la croissance lors de la production des clones. Bien que des cellules aient efficacement survécu en présence de l'antibiotique de sélection, leur prolifération n'a pas été suffisante pour l'établissement de clones stables. Il se pourrait que l'expression de fuite du système Tet-On entraîne suffisamment de Mcl-1 pour tout de même entraîner l'arrêt de croissance des clones ayant intégré le plasmide de réponse. A notre connaissance, une seule publication fait mention de clones exprimant de façon stable la protéine Mcl-1 : les cellules KU812 et K562 ont été transfectées avec le plasmide pSR α -neo-EAT/mcl-1 (Fukuchi *et al.*, 2001). Placé sous le promoteur SR α , promoteur aussi actif que le promoteur CMV, le gène est traduit par des lignées immortelles issues d'une leucémie myéloïde chronique humaine qui prolifèrent plus que les cellules osseuses. Les altérations génétiques qui ont mené ces cellules à devenir cancéreuses leur ont peut-être permis, dans ce cas-ci, de tolérer une surexpression de Mcl-1, contrairement aux lignées Saos 2 ou U2OS.

**Chapitre 2 : L'expression de Bcl-2 et Bfl-1 diminue
l'apoptose dépendante de p53 et régule sa localisation
subcellulaire (Article à soumettre)**

Bcl-2 and Bfl-1 expression decreases p53-dependent apoptosis and modulates its subcellular localization

Ana Sofia SILVA GALLARDO, Catherine STAUDT, Pierre BLONDIAU, Liliana GUTIERREZ, Patrick DUMONT

Laboratory of Cell Biology, Life Science Institute, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Correspondence should be addressed to:

Prof. Patrick DUMONT, PhD.

Laboratory of Cell Biology

Life Science Institute

Université catholique de Louvain (UCL)

Place Croix du Sud 4-5 bte L7.07.02

1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

Tel : +32 10 47 35 24

Fax : +32 10 47 35 15

e-mail : patrick.dumont@uclouvain.be

Abstract

During apoptosis, p53 translocates to the mitochondria where it exerts a pro-apoptotic function by acting analogously to activating BH3-only proteins. Mitochondrial p53 interacts with Bak, a Bcl-2 family member, leading to its oligomerization and the subsequent release of the mitochondrial effectors of apoptosis, such as cytochrome c, from the intermembrane space into the cytoplasm. In addition, p53 also interacts with different anti-apoptotic Bcl-2 family members. We confirm in this study that Bcl-2 interacts with p53. We also report that p53 directly interacts with Bcl-xl, Bfl-1 and Bcl-w. In addition, we found that Bcl-2 and Bfl-1 expression protects PA1 cells from doxorubicin as well as the MDM2 inhibitor nutlin-3a. These two proteins also increase the resistance of U2OS cells to UV-B. Surprisingly, Bcl-2 and Bfl-1 markedly enhance the mitochondrial localization of the tumor suppressor, although they inhibit p53-dependent cell death. This suggests that these anti-apoptotic BCL-2 family members could sequester p53 at the outer mitochondrial membrane, preventing it to trigger Bak oligomerization. Our data underline that agents targeting Bcl-2 and Bfl-1 could, in cancers that retain a wild type version of the tumor suppressor, lead to an enhancement of the mitochondrial activity of p53.

Keywords

p53, Bcl-2, Bfl-1, Bcl-w, mitochondria

Chapitre 2

Abbreviations

Bcl-2: B-cell lymphoma 2
Bcl-w: B-cell lymphoma 2 homolog
Bfl-1: Bcl-2 related gene expressed in fetal liver
BH: Bcl-2 homology domain
DBD: DNA binding domain
FRET: Fluorescence resonance energy transfer
GRS: Glasgow Rearranged Sequence
GST: Glutathione S-Transferase
IC50: Half maximal inhibitory concentration
MDM2: Mouse double minute 2 homolog
MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OMM: Outer Mitochondrial Membrane
rtTA : reverse tetracycline controlled transactivator
TAD: Transactivation domain
UVB: Ultraviolet B

Highlights

- We show that p53 can interact with Bcl-2, Bfl-1 and Bcl-w
- Bcl-2 and Bfl-1 expression inhibit p53-dependent apoptosis
- Bcl-2 and Bfl-1 enhance the mitochondrial localization of p53

Introduction

The tumor suppressor p53 is a major organizer of the cell response to a broad array of insults by regulating apoptosis, cell cycle arrest, senescence, DNA repair and genetic stability (Vaseva and Moll, 2009). The first hint of a transcription-independent apoptotic activity of p53 arise from the discover that p53-dependent apoptosis can occur in presence of transcription or translation inhibitors (Caelles *et al.*, 1994). Moreover, some p53 mutants that have lost their ability to transactivate gene expression are known to trigger apoptosis in human cells as efficiently as p53 wt (Haupt *et al.*, 1995; Kakudo *et al.*, 2005). In addition, p53 can promote apoptosis even when its nuclear import sequence is deleted (Chipuk *et al.*, 2004). The transcript-independent apoptotic activity of p53 relies on its ability to translocate to the mitochondria when the cells encounters an apoptotic stimulus. The study of these pathways has clearly established that in response to a stress signal, cytoplasmic or nuclear p53 rapidly translocates to mitochondria, where it interacts with Bcl-2 family members, leading to mitochondrial outer membrane permeabilization and release of the inter-membrane space apoptotic effectors into the cytosol (Dumont *et al.*, 2003; Leu *et al.*, 2004; Marchenko *et al.*, 2000; Mihara *et al.*, 2003; Vaseva and Moll, 2009).

The tumor suppressor p53 can indeed bind directly pro-apoptotic as well as anti-apoptotic members of the Bcl-2 family (Leu *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003; Sot *et al.*, 2007). The interactions between p53 and the pro-apoptotic members Bax and Bak allow their activation (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004). It results in a conformational change that promotes the oligomerization required for their pro-apoptotic function. An interaction between p53 and the anti-apoptotic members Bcl-2 and Bcl-xl proteins has also been documented. Through these interactions, the tumor suppressor is believed to inhibit the anti-apoptotic function of these proteins, preventing them to bind to the pro-apoptotic members of the family (Ha *et al.*, 2013; Mihara *et al.*, 2003; Sot *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2006). Less is known of a possible interaction of p53 with other anti-apoptotic Bcl-2 family members such as Bfl-1, Bcl-w or Diva.

Chapitre 2

The Bcl2-A1/Bfl-1 protein (Bcl-2 related gene expressed in fetal liver) is also known as GRS (Glasgow Rearranged Sequence). It was identified from fetal liver (Choi *et al.*, 1995) and found to be involved in a chromosomal rearrangement in a chronic myeloid leukemia patient linking the GSR gene to the gene of fibroblast growth factor 4 (Kenny *et al.*, 1997). In cellular systems, Bfl-1 binds to Bak more prominently than to Bax (Vogler, 2012). The functions of Bfl-1 in normal tissues are multiple. Bfl-1 is required for neutrophil and mast cell survival (Hamasaki *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2001) and has a physiological function in mammary cell differentiation (Capuco *et al.*, 2002). Because Bfl-1 is inducible by inflammatory cytokines, it may play a protective role during inflammation (Karsan *et al.*, 1996). Although Bfl-1 overexpression alone is not sufficient to induce tumorigenesis, the protein is overexpressed in a variety of hematological malignancies (leukemia and lymphoma) as well as solid tumors (breast, colon, lung, ovarian and prostate cancers). Moreover, it has been associated with advanced stages or metastatic diseases. Several studies have shown that Bfl-1 may contribute to tumor progression, probably by preventing apoptosis in advanced tumor cells, displaying gross genomic abnormalities and therefore more dependent on the expression of anti-apoptotic proteins (Vogler, 2012). As far as we know, an interaction between Bfl-1 and p53 has never been described before.

B-cell lymphoma 2 homolog (Bcl-w) is an essential regulator of apoptosis during spermatogenesis (Print *et al.*, 1998). It enhances cell survival through its anti-apoptotic activity, as well as the migratory and invasive potential of cancer cells (Bae *et al.*, 2006). Bcl-w is expressed in a variety of cancers, including gastric cancers (Lee *et al.*, 2003), colorectal adenocarcinomas (Wilson *et al.*, 2000) and glioblastoma multiforme (Hoelzinger *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2013). Expression of Bcl-w correlates with expression of p53 wt in colorectal cancer (Wilson *et al.*, 2000). An interaction between the tumor suppressor and Bcl-w has only been reported twice, using nuclear magnetic resonance (Tomita *et al.*, 2006) and GST pull-down assays (Lee *et al.*, 2014).

Our study provides new insights concerning the interaction of p53 with the anti-apoptotic Bcl-2 family members, as well as the impact of an elevated expression of these proteins on p53-dependent

apoptosis and its mitochondrial localization during a stress. We show that both Bcl-2 and Bfl-1 interact with the tumor suppressor and prevent apoptosis triggered by genotoxic stresses. Moreover, Bcl-2 and Bfl-1 enhanced survival following cell exposure to the small molecule nutlin-3a, a direct activator of p53. Interestingly, a high expression of Bcl-2 and Bfl-1 correlated with a markedly enhanced mitochondrial localization of p53, although apoptosis was inhibited. We also report here a direct interaction between p53 and Bcl-w. However, Bcl-w expression had no protective effect in presence of genotoxic stresses or nutlin-3a, suggesting that Bcl-w, at least in the models we used, does not inhibit p53-dependent apoptosis.

Overall, our data suggest that the ability of p53 to directly trigger mitochondrial outer membrane permeabilization can be compromised in presence of an elevated expression of Bfl-1 or Bcl-2. We hypothesize that these anti-apoptotic Bcl-2 family members can sequester the tumor suppressor, preventing it from inducing Bak oligomerization and cytochrome c release.

Materials and Methods

Cell lines and culture

The Saos 2 cell line (p53^{-/-}) is derived from a human osteosarcoma (ATCC® HTB-85TM), whereas the PA1 cell line (p53 wild type) is derived from a human ovarian teratocarcinoma (ATCC® CRL-1572TM). We created the Saos 2 and PA1 cell lines stably expressing Bcl-2 or Bcl-w or Bfl-1 by transfection of pCMV-Tag3-Bcl-2/Bcl-w/Bfl-1. The constructs were stably transfected into the cells, using the cationic polymer transfection reagent JetPEITM (PolyPlus transfection, cat. N°CPT 101). The U2OS cell line, isolated from a human osteosarcoma, was purchased from Clontech (U2-OS Tet-On Cell Line, Catalog N°631143). Each U2OS clone developed possesses a regulator and a response plasmid. The regulator plasmid pUHD17-1neo provides resistance against G418 antibiotic and has the coding region for the regulator protein rtTA (reverse tetracycline controlled transactivator). The cells were stably transfected with pTRE2pur-myc-Bcl-2/Bcl-w/Bfl-1, using JetPEITM (jetPEI[®] transfection reagent, Plyplus transfection TM, 101-10). The response plasmid pTRE2-pur-myc has the coding region for the different anti-apoptotic members of the Bcl-2 family and provides resistance to puromycine. In presence of rtTA protein and doxycycline, expression of the anti-apoptotic Bcl-2 family members is triggered. All the cells were maintained at 37°C in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM InvitrogenTM cat. N°42430) supplemented with 10% fetal bovin serum (BioWhittakerTM Lonza cat. N°DE14-802F), 100 U ml⁻¹ penicillin and streptomycin (GIBCO[®] InvitrogenTM cat. N°15140) in a 5% carbon dioxide humidified atmosphere. Different amounts of G418 (Santa Cruz Biotechnology[®] cat. N°sc-29065B) were added to the culture medium according to the cell type: 400 µg.ml⁻¹ for Saos 2 cell lines, 300 µg.ml⁻¹ for PA1 cell lines and 200 µg.ml⁻¹ for U2OS clones.

Co-immunoprecipitation

Whole-cell extracts (500 µg of proteins) of Saos 2 cells overexpressing Bcl-2 were prepared in 1% CHAPS buffer. The protein content of the lysates was measured by the Bradford method using the Dc Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories). The proteins were immunoprecipitated overnight at 4°C with the rabbit FL-393 anti-p53 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology[®] cat. N°sc-6243). The proteins were then incubated for 30 min at 4°C with sepharose beads coated with protein A (Protein A-Sepharose[®] from *Staphylococcus aureus*, **P3391 Sigma**). After centrifugation, proteins were washed twice in 0.5% NP-40 buffer (0.5% Igepal CA-630, **I8896 Sigma**, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8) and once with RIPA buffer (150

mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton 100x, 0.1% SDS, 1% Na Deoxycholate). All buffers were supplemented with protease inhibitors (Roche, Cat. N°11836153001).

Western blot

Proteins were resolved by SDS-PAGE in 10-15% Tris-Glycine gels, and transferred onto nitrocellulose membranes AmershamHybond™ ECL™, (GE healthcare cat. N°RPN203D). Blots were blocked for 30 min in PBS containing 0.1% Tween-20 (PBS-T) and 5% non fat dry milk. After blocking, the membranes were probed for 1 h with the primary antibody diluted in PBS-T containing 5% non fat dry milk. The membranes were washed three times for 5 min with PBS-T, and probed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, used at a 1:6,000 dilution in PBS-T containing 5% non fat dry milk. After three washes in PBS-T, the membranes were developed using chemiluminescent substrate (Western Lighting from PerkinElmer) and exposed to Amersham ECL Hyperfilms. The following primary antibodies were used in this study: anti-p53 monoclonal (dilution 1:400; Ab-6 (Pantropic) Mouse mAb (DO-1), Calbiochem®, cat. N°OP43), anti-β-actin (dilution 1:5,000; Clone AC15, Sigma Aldrich, cat. N° A1978), anti-c-Myc (dilution 1:1,000; 9E10, Santa Cruz Biotechnology® cat. N°sc-40), anti-GRP75 (dilution 1:400; C-19, Santa Cruz Biotechnology® cat. N°sc-1058), anti-PCNA (dilution 1:1,000; PC10, Santa Cruz Biotechnology® cat. N°sc-56), anti-HSP60 (dilution 1:200; (K-19)-R, Santa Cruz Biotechnology® cat. N°sc-1722-R), anti-Lamin (dilution 1:400; Lamin A/C (H-110) Santa Cruz Biotechnology® cat. N°sc-20681).

Recombinant protein production

Recombinant GST-tagged proteins were generated using the pGEX-2T vector. They were induced for 4 h with 0.1 mM IPTG in *E. coli* BL21 cells. For purification of GST-Bcl-xl, GST-Bcl-w and GST-Bfl-1, the bacterial pellets were resuspended in STE buffer (10 mM Tris at pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, supplemented with 100 µg.ml⁻¹ lysozyme, 1 mM PMSF and 10 µg.ml⁻¹ Aprotinin). After 15 min at 4°C, 5 mM of DTT and 1,5% sarkozyl were added and samples were sonicated. Centrifugation at 7,000 *g* for 30 min at 4°C pelleted cell debris. The supernatants were supplemented with 2% Triton-X100 and applied to glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare). After washes with PBS, we eluted the proteins with 10 mM glutathione in 50 mM Tris-NaCl at pH 8. The GST-labelled Bcl-xl, Bcl-w and Bfl-1 proteins were concentrated using Millipore Amicon Ultra Centrifugal Filter Device – 50 kDa (Millipore).

Chapitre 2

GST-Pull down assay

In vitro transcription-translation of p53 wt was performed with the TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega Corporation, Madison, WI). For *in vitro* mixing experiments, 1 µg of GST-labelled Bcl-xl, Bcl-w or Bfl-1 proteins were incubated with 15 µl of *in vitro* translated p53 wt in 300 µl of binding buffer (20 mM HEPES at pH 7.9, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.02% NP-40, 10% glycerol) supplemented with protease inhibitors. Proteins were bound for 1 h at 4°C and again for 30 min at 4°C, after addition of 30 µl of 50% (vol/vol) Glutathione SepharoseTM 4B (GE Healthcare, cat. N° 17-0756-01). Bound complexes were washed three times in wash buffer (20 mM HEPES at pH 7.9, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% NP-40, 10% glycerol). Bound proteins were eluted in 1 × Laemmli sample buffer and separated by 10% SDS-PAGE.

Cell fractionation for the isolation of mitochondria

Cells were scraped and centrifuged at 650 *g* for 6 min at 4°C. Cells pellets were washed twice with ice-cold PBS and resuspended in 1 ml of buffer 1 (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 300 mM mannitol) supplemented with protease inhibitors. Cells were lysed by repeated passages through a 23G needle. The samples were centrifuged twice at 500 *g* for 5 min at 4°C and the supernatants were collected. The samples were next centrifuged at 9000 *g* for 10 min at 4°C and the supernatants, corresponding to the cytosolic fraction, were isolated and stored at -20°C. The pellets, corresponding to the mitochondrial fraction, were resuspended in 500 µl of buffer 1 and centrifuged at 500 *g* for 6 min at 4°C. The supernatants were collected and centrifuged at 9000 *g* for 10 min at 4°C and then the pellets were resuspended in 120 µl of buffer 2 (10 mM HEPES, 0.2 mM EGTA, 1 mM KH₂PO₄-KOH, 300 mM mannitol) supplemented with protease inhibitors, and stored at -20°C until analysis.

Cell fractionation for the preparation of nuclei

Cells were scraped and centrifuged at 500 *g* for 10 min at 4°C. Cells pellets were washed twice with ice-cold PBS and resuspended in 10 volumes of hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT) supplemented with protease inhibitors. After 15 min on ice, the plasma membranes were disrupted by repeated passages through a 23G needle. The samples were centrifuged at 4000 *g* for 2 min at 4°C and the supernatants were collected. The pellets were resuspended in ice-cold hypotonic buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol) supplemented with protease inhibitors. After 1 h on ice, the samples were centrifuged at 14000 *g* for 5 min at 4°C. The supernatant (nuclear fraction) was isolated and stored at -20°C.

MTT assay

Cells were seeded at 5,000 cells per well in 96-well plates and submitted 24h later to treatments with doxorubicin (0 – 10 – 25 – 50 – 100 – 1000 nM) or nutlin-3a (0 – 1 – 2 – 4 – 8 – 16 – 32 μ M). The treatments last for 72 h and each assay was repeated 6 times. At the end of treatments, cells were incubated with complete DMEM medium containing 0,5 mg.ml⁻¹ 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (Sigma Aldrich). After 3h, the MTT solution was discarded and the formazan produced by the living cells was solubilized with isopropanol/1 M HCl (24 : 1 v/v). The absorbance at 560 nm was recorded on a spectrophotometer (BIO-Rad model 680 XR) and we subtracted the absorbance at 670 nm. IC50 is the concentration of drug that inhibits cell growth by 50%. We determined the IC50 based on the nutlin-3a or doxorubicine-response curves, by plotting a graph of log drug concentrations versus percent cell survival, the untreated control representing 100%.

UVB treatment

Cells were seeded at 3.10⁶ cells per plate in a 100 mm cell culture dishes. After 24h, expression of the anti-apoptotic Bcl-2 family members was induced or not with 1 μ g.ml⁻¹ doxycyclin (Tet-on). The next day, the culture medium was removed and cells were covered with 1.5 ml of PBS before exposure or not to 0.03 J/cm² of UVB. Fresh culture medium containing 10% FBS was then added to the cells. After 24h, viability was determined by labelling with LDS-751/PI (Guava Viacount, Millipore) followed by flow cytometry analysis (Guava easyCyte™6HT/2L Flow Cytometer, Millipore). Statistical analysis were performed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-test. Data are reported as means $\pm$ standard error (SEM).

Data and statistical analysis

Statistical analysis was performed by the ANOVA I test complemented with a Newman-Keuls test. Significant differences between data sets were defined as *** p <0.001, ** p <0.01. All data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Results

Interactions between p53 and anti-apoptotic Bcl-2 family members

We first sought to determine whether Bcl-2, Bfl-1 and Bcl-w are able to interact with p53. The anti-apoptotic Bcl-2 protein is a known molecular target of p53 at the mitochondria. Its interaction with p53 leads to inhibition of its anti-apoptotic activity, thereby promoting cell death (Ha *et al.*, 2013; Sot *et al.*, 2007). An interaction between Bcl-w and the tumor suppressor has also been described previously (Lee *et al.*, 2014), while there is no report in the literature of an interaction between Bfl-1 and p53. In order to confirm the interaction between p53 and Bcl-2, we created Saos 2 clones (p53^{-/-}) stably expressing c-myc tagged Bcl-2. Bcl-2 overexpression was verified by western blot, using a primary antibody directed against Bcl-2 (Figure 1A) or its N-terminal c-myc tag (data not shown). After transient transfection with wt p53, co-immunoprecipitations were performed. Data indicate an interaction between p53 and Bcl-2, in clones stably expressing Bcl-2 but not in clones transfected with the empty plasmid (Figure 1B).

The interaction of p53 with Bcl-w and Bfl-1 was analyzed *in vitro* by GST pull-down assays. GST-tagged Bcl-w and Bfl-1 were purified from *E. coli* BL21, as well as GST-Bcl-xl. As the interaction between p53 and Bcl-xl is well documented (Mihara *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2013), we used GST-Bcl-xl as a positive control. The purified proteins were involved in GST-pull down assays in presence of *in vitro* translated wt p53 (Figure 1C). Results show an absence of interaction between p53 and GST. As expected, Bcl-xl interacted with p53, in accordance with different reports from the literature (Chipuk *et al.*, 2005; Ha *et al.*, 2013; Mihara *et al.*, 2003; Petros *et al.*, 2004; Sot *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2006). Moreover, a direct interaction between p53 and Bfl-1 as well as Bcl-w was evidenced (Figure 1C). The data reinforce the knowledge that the ability to interact with the tumor suppressor p53 is a common property of the anti-apoptotic Bcl-2 family members.

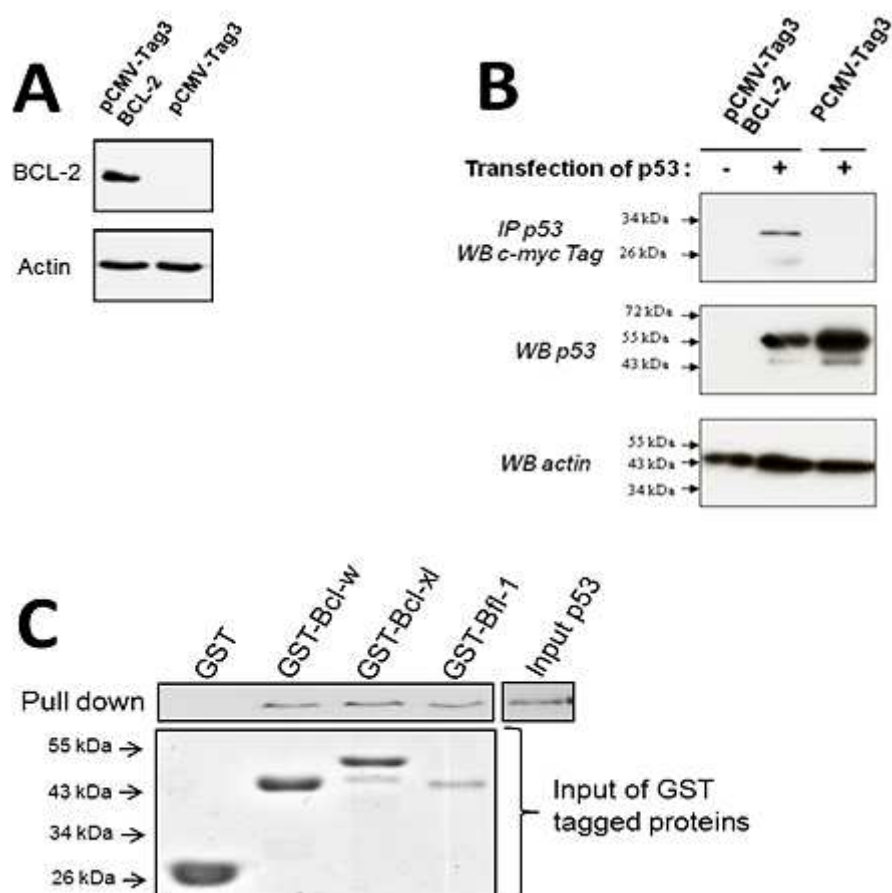


Figure 1: The tumor suppressor p53 interacts with various anti-apoptotic Bcl-2 family members. **(A)** Western Blot analysis of Bcl-2 expression in Saos 2 clones stably transfected with the pCMV-Tag3-Bcl-2 vector or the empty plasmid. **(B)** Analysis of interactions between p53 and c-myc tagged Bcl-2. The tumor suppressor p53 was transiently transfected or not in stable Saos 2 clones. The interaction between p53 and Bcl-2 was identified by co-immunoprecipitation followed by a Western blot analysis using an antibody against the c-myc tag of Bcl-2. **(C)** GST Pull-down assay displaying the interaction of p53 with Bcl-w, Bcl-xl and Bfl-1. The proteins Bcl-w, Bcl-xl and Bfl-1 fused to GST, and purified from *E. coli* BL21 bacteria, were engaged in GST pull-down reactions in presence of *in vitro* translated p53. The sizes and input of the different purified proteins are shown on the lower gel, while the upper gel indicates the GST pull-down outcome. The input of p53 is shown apart since we deleted a column of the western blot result.

Chapitre 2

An elevated expression of Bcl-2 and Bfl-1 enhances resistance of PA1 cells to doxorubicin and nutlin-3a

We next analyzed whether expression of Bcl-2, Bfl-1 and Bcl-w could inhibit p53-dependent cell death triggered by doxorubicin and nutlin-3a.

We first verified that the cytotoxic activity of these two molecules depended on the presence and activity of the tumor suppressor using p53 wt and ko HCT116 colorectal cancer cell lines (Figure 2A). Doxorubicin is an intercalating agent and topoisomerase II inhibitor that causes apoptosis at least in part by generating DNA damage (Tang *et al.*, 2004). Nutlin-3a inhibits the interaction of p53 with MDM2 by binding the p53 interaction site of MDM2. Through the inhibition of this ubiquitin E3 ligase, nutlin-3a stabilizes the tumor suppressor (Drakos *et al.*, 2011; Vassilev *et al.*, 2004). After 72h of incubation in presence of increasing concentrations of doxorubicin (from 0 to 1 μ M) or nutlin-3a (from 0 to 50 μ M), viability was measured by MTT assays and IC50s were determined. Data indicate that IC50s of p53 wt HCT116 cells are markedly lower than that of p53 ko cells, verifying that cell death triggered by doxorubicin or nutlin-3a is p53-dependent (Figure 2A).

To study the impact of the anti-apoptotic Bcl-2 family members on p53-dependent cell death, PA1 cell lines (p53 wt) stably expressing c-myc tagged Bcl-2, Bcl-w or Bfl-1 were established. To monitor the expression and localization of these proteins, we isolated the cytosolic and mitochondrial fractions and we performed a Western blot analysis with an antibody directed against the c-myc tag (Figure 2B). Bfl-1 was detected in the cytosolic fraction but not at the mitochondria. Bcl-2 was only present in the mitochondrial fraction, while Bcl-w was detected in both the mitochondrial and cytosolic fractions (Figure 2B).

PA1 cells expressing or not the anti-apoptotic Bcl-2 family members were next treated with doxorubicin and cell viability was assessed by MTT assays after 72h of incubation. We found that expression of Bcl-2 and Bfl-1 markedly reduces the sensitivity of PA1 cells to doxorubicin (Figure 2C). However, Bcl-w failed to enhance cell resistance. Indeed, the IC50 obtained for cells transfected with the

empty plasmid was 7.5 nM, while that of cells expressing Bcl-w was 9.3 nM. In contrast, the IC₅₀ of cell lines expressing Bcl-2 and Bfl-1 were respectively 50 and 52.3 nM.

The same experiments were performed in presence of increasing concentrations of nutlin-3a. Data obtained with this specific activator of p53 were very similar to these recorded with doxorubicin (Figure 2D). Overexpression of Bcl-2 and Bfl-1 protected cells against nutlin-3a, whereas no significant effect was detected in presence of Bcl-w. IC₅₀s were also determined: 2.8 μ M for cells transfected with the empty plasmid, 5.8 μ M for cells overexpressing Bcl-w, and respectively 29.4 μ M and 28.6 μ M for cells overexpressing Bcl-2 and Bfl-1.

In summary, the combined data indicate that overexpression of Bcl-2 or Bfl-1 protects PA1 cells against stimuli known to trigger p53-dependent cell death. In contrast, overexpression of Bcl-w does not modulate sensitivity to doxorubicin or the MDM2 inhibitor nutlin-3.

Chapitre 2

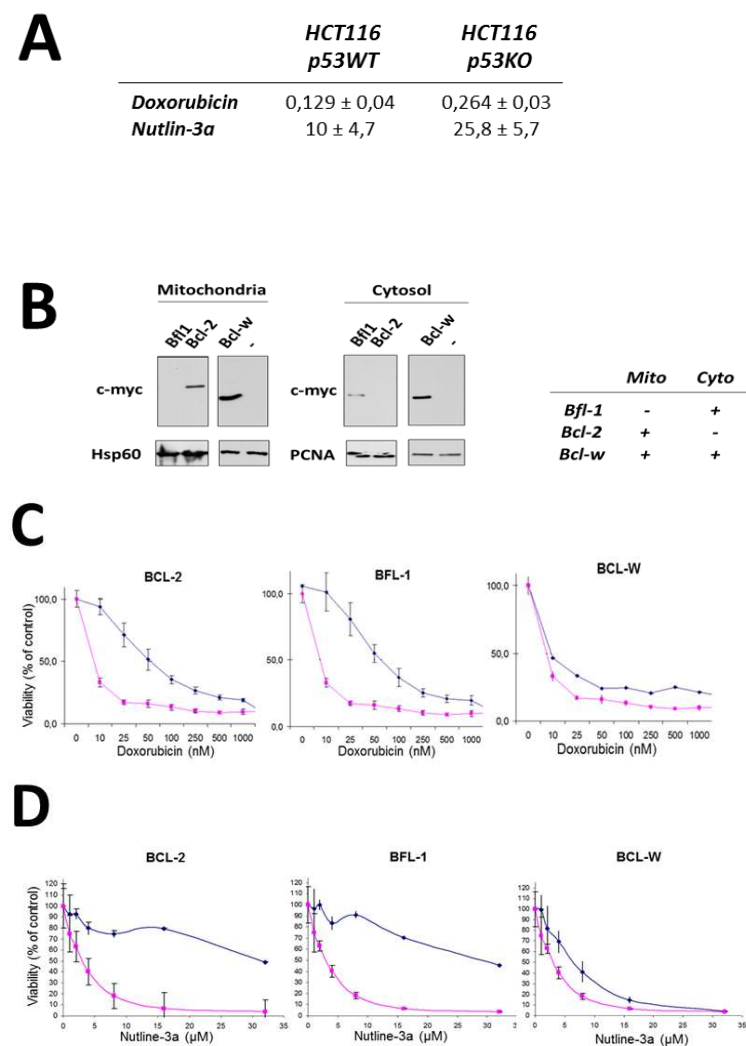


Figure 2: Bcl-2 and Bfl-1 reduce the sensitivity of p53 wt PA1 cells to doxorubicin and nutlin-3a. (A) IC50 (in μM) of doxorubicin and nutlin-3a in HCT116 p53 wt and ko cells. Cells were exposed for 72 h to increasing concentrations of doxorubicin (from 0 to 1000 nM) or nutlin-3a (from 0 to 50 μM). Viability was thereafter measured by MTT assays. (B) Expression and subcellular localization of Bcl-2, Bcl-w and Bfl-1. A differential centrifugation method was used to isolate the mitochondrial and cytosolic fractions of PA1 cells stably expressing the Bcl-2 family members. A Western blot analysis was next performed using an antibody against the c-myc tag carried by the proteins. HSP60 and PCNA were used as loading

control for the mitochondrial and cytosolic fraction respectively. (C & D) Viability of PA1 cells transfected with the empty pCMV-Tag3 plasmid (in pink) or stably expressing the different anti-apoptotic Bcl-2 family members (in blue). Cells were exposed to increasing concentrations of (C) doxorubicin (from 0 to 1000 nM) or (D) nutlin-3a (from 0 to 32 μ M). Viability was determined by MTT assays after 72 h of treatment. The error bars indicates the standard deviation of the sample.

An elevated expression of Bcl-2 and Bfl-1 protects U2OS osteosarcoma cells against apoptosis induced by UVB exposure

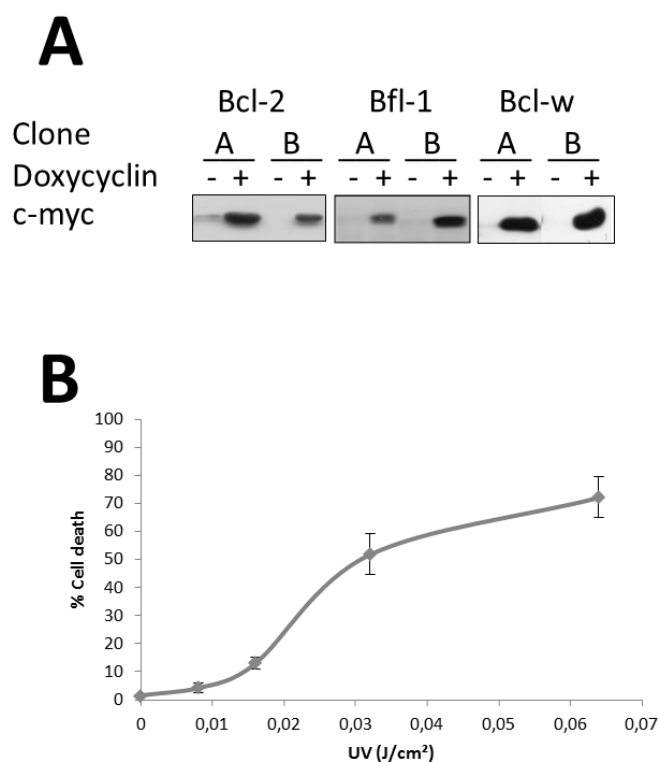


Figure 3: Inducible expression of Bcl-2, Bfl-1 and Bcl-w in U2OS Tet-on clones. (A) Analysis of expression of plasmids pTRE2pur-myc-Bcl-2 or Bfl-1 or Bcl-w clones A and B, with or without doxycycline induction. (B) Dose-dependent cell death in cells treated with UVB. U2OS cells transfected with the empty pTRE2pur-myc plasmid were exposed to UVB (from 0 to 0.064 J/cm²). Apoptosis was quantified by flow cytometry analysis after LDS-751/IP labeling. The error bars indicates the standard deviation of the sample.

Chapitre 2

In order to confirm in a different model that an elevated expression of Bcl-2 and Bfl-1 enhances resistance to p53-dependent cell death, we created inducible U2OS clones (Tet-on system). Induction of expression of the different anti-apoptotic Bcl-2 family members in presence of 1 μ M doxycycline was monitored by Western blot analysis after 24 h of incubation (Figure 3A). A dose-response curve was next performed to determine the adequate UVB dose for apoptosis induction (Figure 3B). U2OS cells stably transfected with the empty plasmid pTRE2pur-myc were treated with 0.008, 0.016, 0.032 and 0.064 J/cm² UVB. Viability was determined 24 h later by flow cytometry analysis after labelling with LDS-751 and propidium iodide. The intermediate dose of 0.03 J/cm² was selected for further experiments (Figure 3B).

U2OS clones were thus exposed to 0.03 J/cm² UVB, with or without induction of expression of Bcl-2, Bfl-1 and Bcl-w (Figure 4A). Bcl-2 expression markedly protected U2OS cells against UVB-induced apoptosis. The protective effect was statistically significant and was observed in two different clones. Similar results were reached in clones overexpressing Bfl-1. However, no statistically significant protection was observed in clones expressing Bcl-w (Figure 4A). In addition, a Western blot analysis was performed to determine p53 level. Importantly, we observed that expression of the different anti-apoptotic Bcl-2 family members does not diminish p53 induction in presence of UVB (Figure 4B). The absence of a significant protection in presence of Bcl-w could be explained by a potentially leaky expression of the protein. Indeed, we can observe that Bcl-w is expressed, at a low level, even in the absence of doxycycline (Figure 4B). This hypothesis could also explain the little rate of cell death of Bcl-w expressing cells exposed to UVB, with or without doxycycline (~20%), by comparison to clones overexpressing Bcl-2 of Bfl-1 (~40-50%) (Figure 4A).

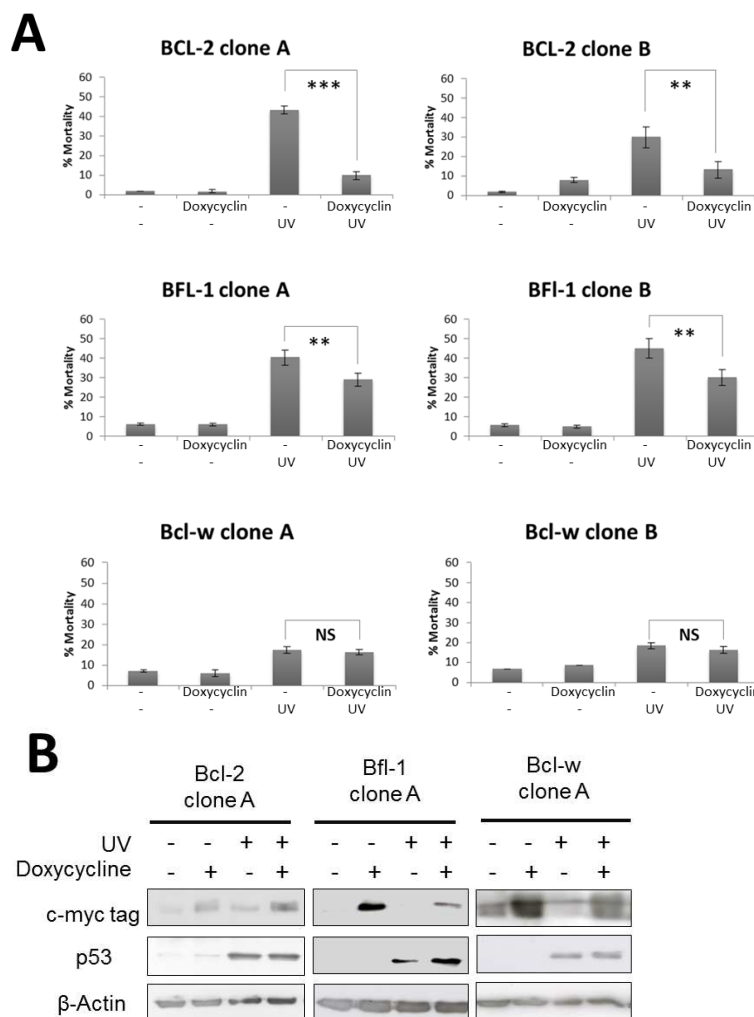


Figure 4: Bcl-2 and Bfl-1 protect U2OS cells from UV-B induced apoptosis. (A) Viability of U2OS tet-on clones was analyzed 24 h after exposure or not to 0.03 J/cm² UVB, in presence or not of doxycycline to induce expression of the different anti-apoptotic Bcl-2 family members. Doxycycline was added to the culture medium 24h before the UVB stress. Statistical analysis was performed by the ANOVA I test complemented with a Newman-Keuls test: *** p < 0.001, ** p < 0.01, NS Not Significant. (B) Western blot analysis of the expression of p53 and the anti-apoptotic Bcl-2 family members. Cells were treated as in (A), in presence or not of doxycycline. Total protein extracts were prepared 24 h after the UVB stress. Detection of Bcl-2, Bfl-1 and Bcl-w was achieved with an antibody directed against the c-myc tag. Detection of β-actin was used as loading control.

An elevated expression of Bcl-2 and Bfl-1 enhances mitochondrial and cytosolic localization of p53 in U2OS cells exposed to UVB

Since Bcl-2 and Bfl-1 interacted with p53 and caused a marked decrease of p53-dependent apoptosis, we wanted to determine whether these two anti-apoptotic Bcl-2 family members could modulate its mitochondrial activity and more specifically inhibit its mitochondrial translocation in cells exposed to an apoptotic stimulus. To this purpose, U2OS inducible clones were submitted to 0.03 J/cm² UVB in presence or not of doxycycline and we isolated the mitochondrial and cytosolic fractions at different time points. A western blot analysis was then carried out to measure the presence of p53 in these fractions over time (Figure 5).

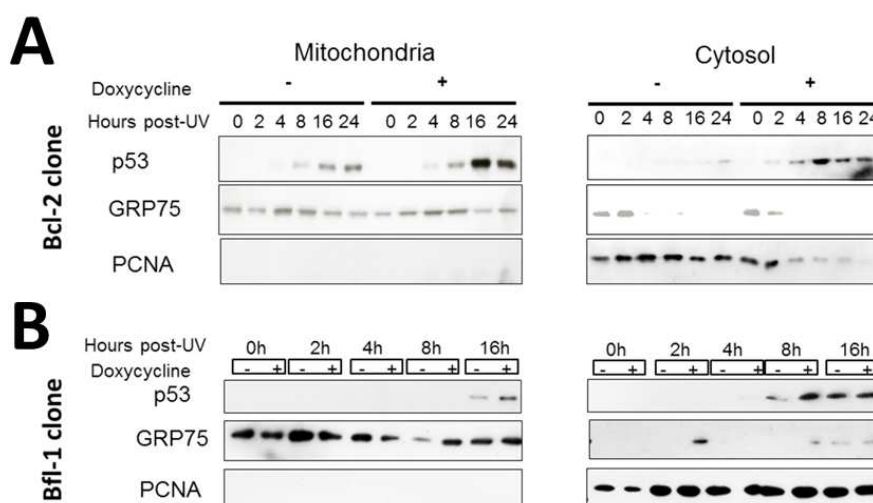


Figure 5: The mitochondrial translocation of p53 is enhanced in presence of Bcl-2 or Bfl-1. (A) Bcl-2 U2OS Tet-On cells were treated with 0.03 J/cm² UVB, in presence or not of doxycycline. The mitochondrial and cytosolic fractions were isolated at 0, 2, 4, 8, 16 and 24 h after UVB exposure. A Western blot analysis was next performed to determine the presence of p53 in both fractions. GRP75 is exclusively mitochondrial whereas PCNA is located in both the nucleus and the cytosol. (B) Bfl-1 U2OS Tet-On cells were treated with 0.03 J/cm² UVB, in presence or not of doxycycline. We isolated the mitochondrial and cytosolic fractions at 0, 2, 4, 8 and 16 h after UVB exposure and analyzed by Western blot the presence of p53 in both.

Analysis of the cytosolic fractions points out an increased level of p53 when Bcl-2 is expressed (Figure 5A). This increased p53 level is not linked to a global enhancement of p53 stabilization and induction. Indeed, p53 level in total extracts is not modulated by Bcl-2 expression (Figure 4B). Moreover, analysis of the mitochondrial fractions underline that p53 mitochondrial translocation is enhanced at 8, 16 and 24h post-UV light treatment. Densitometry analysis indicated that p53 mitochondrial level was increased by 3 to 7 times (Data not shown). An increased cytosolic and mitochondrial translocation of p53 was also observed in U2OS cells at respectively 8 h and 16 h after UVB treatment, in presence of Bfl-1 (Figure 5B). This enhancement of p53 mitochondrial translocation in presence of Bcl-2 and Bfl-1 concomitantly to a decreased apoptosis is rather surprising. It suggests that these two proteins can act as an anchor for p53. However, they likely have an inhibitory effect on p53 activity, by sequestering the tumor suppressor and preventing it from binding to and inducing Bak or Bax oligomerization.

To further confirm these data, the U2OS inducible clones were again submitted to 0.03 J/cm² UVB in presence or not of doxycycline, and we isolated the mitochondrial, cytosolic and nuclear fractions of the clones as well as total protein extracts (Figure 6).

Bcl-2 was abundantly present in the mitochondrial fractions and was also detected in the cytosol (Figure 6A). The tumor suppressor p53 displayed an increased level at the mitochondria in presence of Bcl-2 overexpression, at the different time points. An increase of p53 in the cytosol was also recorded, although the signal remained low, when Bcl-2 was expressed. We can also notice that p53 level in total extracts is not markedly modified in presence of Bcl-2. Additionally, no depletion of p53 from the nuclear fraction was observed (Figure 6A).

Chapitre 2

Similar results were recorded in the Bfl-1 U2OS Tet-On clone (Figure 6B). We found an equal level of p53 in total protein extracts as well as nuclear extracts, in presence or not of Bfl-1. This Bcl-2 family member was mainly present in the mitochondrial fraction. It could however be detected in the cytosol at later time points after UVB treatment (16 and 24h). We found that p53 presence at the mitochondria was markedly increased at 8h in presence of Bfl-1, suggesting that Bfl-1 facilitates p53 mitochondrial translocation. An increased p53 level was also recorded at 8h in the cytosolic fraction (Figure 6B).

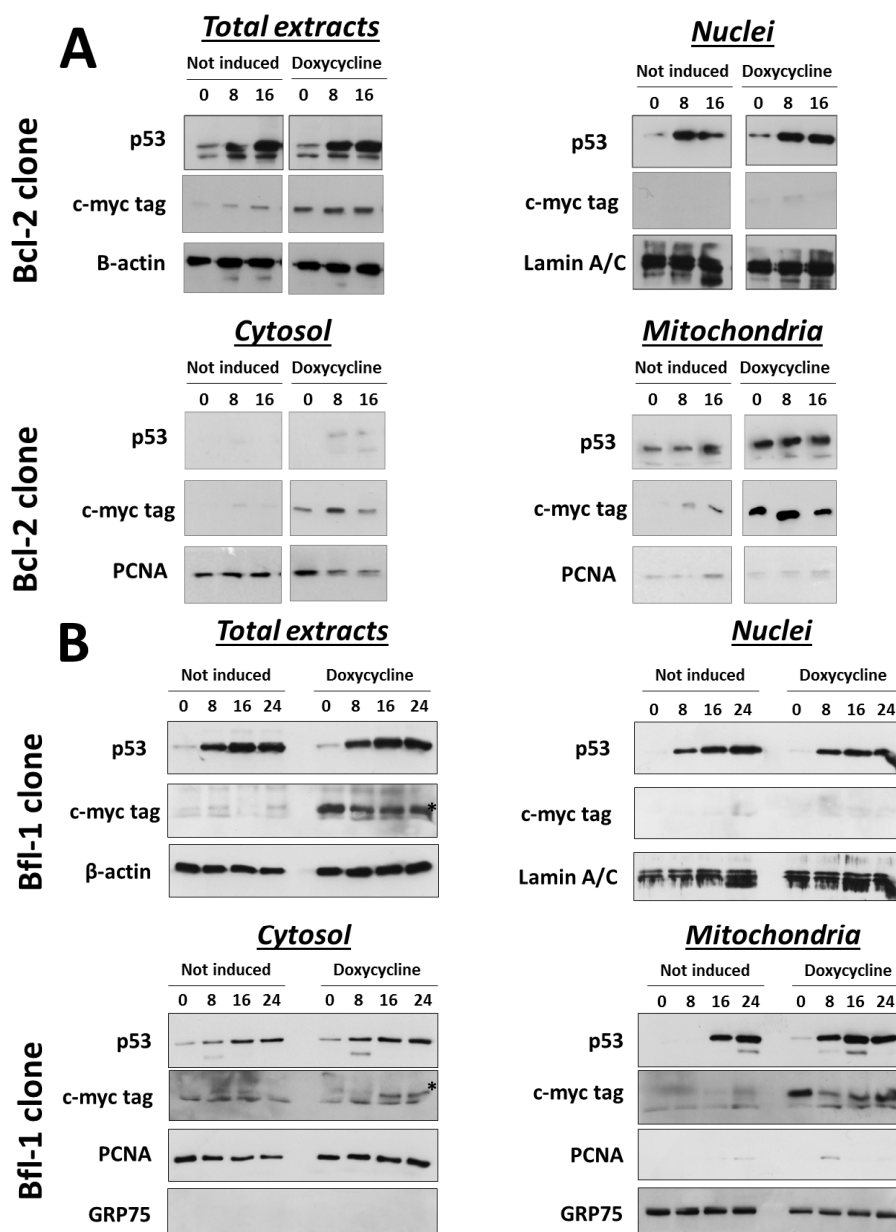


Figure 6: The mitochondrial translocation of p53 is enhanced in presence of Bcl-2 or Bfl-1. (A) Bcl-2 U2OS Tet-On cells were treated with 0.03 J/cm² UVB, in presence or not of doxycycline. Total protein extracts as well as nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions were isolated at 0, 8 and 16 h after UVB exposure. A Western blot analysis was next performed to determine the presence of Bcl-2 (c-myc tag) and p53 in all fractions. GRP75

Chapitre 2

is exclusively mitochondrial whereas PCNA is located in both the nucleus and the cytosol. (B) Bfl-1 U2OS Tet-On cells were treated with 0.03 J/cm² UVB, in presence or not of doxycycline. We isolated the total protein extracts as well as the nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions at 0, 8, 16 and 24 h after UVB exposure and analyzed by Western blot the presence of Bfl-1 (c-myc tag*) and p53 in all fractions.

Discussion

The transcription-independent pathway of p53-dependent apoptosis relies on its mitochondrial activity. Indeed, following various apoptotic insults, a fraction of the tumor suppressor protein relocates at the OMM. There, it interacts with Bak, a pro-apoptotic Bcl-2 family member, in order to induce its oligomerization and the subsequent permeabilization of the OMM (Chipuk *et al.*, 2004; Green and Kroemer, 2009). In addition, p53 interacts with Bcl-2 and Bcl-xl, leading to their inhibition and the release of pro-apoptotic members that were sequestered (Chipuk *et al.*, 2005; Leu *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003). Therefore, p53 can act as a direct activator of Bak, or as a de-repressor freeing pro-apoptotic members from anti-apoptotic Bcl-2 family members (Green and Kroemer, 2009).

We report here that p53 interacts with the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w and Bfl-1. GST pull-down assays reveal a direct interaction of p53 with Bcl-xl, Bcl-w and Bfl-1 whereas the interaction between p53 and Bcl-2 was observed by immunoprecipitation. While this is the first report of an interaction between Bfl-1 and p53, interaction of p53 with Bcl-2, Bcl-xl and Bcl-w were previously observed (Ha *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Mihara *et al.*, 2003; Sot *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2006). Our results confirm those of Lee and team, where they show by GST pull-down that p53 interacts with Bcl-2 and Bcl-w (Lee *et al.*, 2014). To further confirm the interaction between Bfl-1 and p53, it would be interesting to analyse it in presence of DNA. As p53 is a transcription factor, Bfl-1 and DNA will be in competition to interact with the tumor suppressor (Sot *et al.*, 2007). Therefore, the interaction will be specific if it takes place without DNA and if the complex is disrupted in presence of DNA. The concentration of DNA necessary for the disruption of the complex will be the lowest if the interaction directly involves p53 DBD. To determine the binding site of p53 in this interaction, we could perform GST-pull down assays using GST-Bfl-1 on one hand and different p53 deletion constructs on the other hand.

After determining that an interaction exists between the tumor suppressor and Bcl-2, Bfl-1 and Bcl-w, we further investigated the subcellular localization of these anti-apoptotic proteins. In stably

Chapitre 2

transfected PA1 cell lines, we found that Bfl-1 is cytosolic, Bcl-2 mitochondrial and Bcl-w present in both the mitochondria and the cytosol. These localizations confirm those described by Youle and Strasser, regarding Bcl-2 and Bcl-w (Youle and Strasser, 2008). However, some studies indicate that in healthy cells, Bcl-w is located in the cytosol since its C-terminal transmembrane domain can be sequestered in its own hydrophobic pocket (Denisov *et al.*, 2003; Hinds *et al.*, 2003). After an apoptotic stimulus, interaction of BH3 only proteins with the hydrophobic loop of Bcl-w releases the transmembrane domain, allowing the protein to translocate to the mitochondria and insert in the OMM (Jeong *et al.*, 2004; Wilson-Annan *et al.*, 2003). Presumably, the localization of Bcl-w and its relative abundance in subcellular compartment may vary depending on expression level and cell type (Youle and Strasser, 2008). Unlike Bcl-2 and Bcl-w, the C-terminal end of Bfl-1 has hydrophilic residues that interrupts the hydrophobic transmembrane domain (D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998). The amphipathic helix $\alpha 9$ can adopt two different conformations. First, the helix can locate in the hydrophobic pocket, transforming Bfl-1 into a compact molecule which restricts access to BH3 only proteins. Second, the molecule is extended with the $\alpha 9$ helix protruding from the heart of the molecule and therefore potentially able to insert into membranes (Brien *et al.*, 2009). The localization of Bfl-1 may then vary depending on the cell type and also the kind of stress. Our data indicate that, in unstressed U2OS Tet-On cells, Bfl-1 is mainly localized at the mitochondria. After UVB treatment, Bfl-1 however becomes detectable in the cytosolic fraction at late time points (16 and 24 h). In PA1 cell lines and without any stress, Bfl-1 was mainly localized in the cytosol. It would be interesting to also determine the localization of Bfl-1 in PA1 cell lines treated with doxorubicin and nutlin 3a.

We next investigated the impact of an elevated level of Bcl-2, Bcl-w and Bfl-1 on p53-dependent apoptosis. Bcl-2 and Bfl-1 protected cells against apoptosis triggered by doxorubicin, nutlin-3a and UVB. We show that doxorubicin and nutlin-3a are p53-dependent for their cytotoxic activity. The tumor suppressor p53 is highly expressed under UVB, and literature support the evidence that UVB induced apoptosis is also p53-dependent (Brash *et al.*, 1991; Davenport *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999; Levine, 1997; Liu *et al.*,

1994). Other results confirm ours as they point out that Bfl-1 overexpression confers resistance to etoposide (Wang *et al.*, 1999) or cisplatin (Cheng *et al.*, 2000). No statistically significant protection has been highlighted under Bcl-w overexpression, despite the fact that enforced expression of Bcl-w rendered lymphoid and myeloid cells refractory to apoptosis induced by cytokine withdrawal or drug treatment (Gibson *et al.*, 1996).

It is rather surprising to observe that both Bcl-2 and Bfl-1 are highly protective while Bcl-w has no effect on cell survival, since the three proteins interact with p53. When a protein interacts with the DBD of p53, it represents an allosteric obstruction for its interaction with protein partners such as Bak, potentially leading to inhibition of its mitochondrial activity. We can hypothesize that when Bcl-2 or Bfl-1 are binding p53 DBD, they prevent the interaction with Bak and thus impede its activation and oligomerization. Likely, this effect depends on the relative affinity of the different Bcl-2 family members for p53 DBD. For instance, it has been published that p53 DBD has more affinity for Bcl-xl than for Bak (Sot *et al.*, 2007). We can hypothesize that p53 DBD has more affinity for Bak than for Bcl-w since there is no protective effect of Bcl-w. It is also possible that Bcl-w binds better to p53 TAD than to p53 DBD, allowing the interaction between Bak and p53 and the subsequent activation and oligomerization of Bak. Another possible explanation, at least for the UV-B treatment, is that Bcl-w has a continuous protective effect because the clone expresses Bcl-w, although at a low level, even in the absence of doxycycline. This hypothesis could explain the low rate of cell death of Bcl-w expressing cells in comparison to clones expressing Bfl-1 and Bcl-2, as well as the little difference between the conditions "UVB without doxycycline" and "UVB with doxycycline".

Our data also reveal that Bcl-2 and Bfl-1 enhance the cytosolic and the mitochondrial localization of p53, and likely favor anchorage of the tumor suppressor at the OMM. To conciliate the fact that Bcl-2 inhibits apoptosis while enhancing the mitochondrial translocation of p53, which should trigger apoptosis, we hypothesize that Bcl-2 inhibits p53 by sequestering it. Since Bcl-2 is a transmembrane protein of the OMM and the endoplasmic reticulum, the accumulation of p53 in the cytosolic and mitochondrial compartments when Bcl-2 is

Chapitre 2

present at a high level could be explained by this sequestration hypothesis. The interaction with Bax or Bak would only take place if there is an excess of p53 in the cell. The same hypothesis can be applied to Bfl-1 as an increased level of p53 is observed in cytosolic and mitochondrial compartments when Bfl-1 is overexpressed.

In order to further confirm that the protective effect of Bfl-1 and Bcl-2 is due to a sequestration of p53 and the inhibition of its mitochondrial activity, it would be important to characterize the transcriptional activity of the tumor suppressor in presence and absence of a high expression of Bfl-1 and Bcl-2. Our data already show that Bfl-1 and Bcl-2 do not trigger a decrease of nuclear p53 level. However, it would be informative to perform a Western blot analysis to detect the proteins p21, Puma and Noxa in the U2OS Tet-On clones exposed or not to UVB, in presence or not of Bfl-1 and Bcl-2 expression.

In summary, we show that there is an interaction between p53 and Bcl-2, Bcl-w as well as Bfl-1. Many cases of cancer refractory to conventional treatments are known to overexpress these anti-apoptotic proteins (Hoelzinger *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2013; Vogler, 2012; Wilson *et al.*, 2000). We have established that, in presence of Bcl-2 and Bfl-1, cells become resistant to agents such as doxorubicin, nutlin-3a and UVB. This resistance could, at least partly, be explained by the affinity of the tumor suppressor p53 for these anti-apoptotic proteins. We hypothesize that the complexes p53-Bfl-1 or p53-Bcl-2 lead to the sequestration of the tumor suppressor and the impairment of its mitochondrial activity. Of note, it was previously reported that, in presence of a stress, the level of mitochondrial p53 depends on Bak expression. Indeed, Leu and team showed that in Bak wt MEFs, p53 translocates to the mitochondria but is unable to do so in Bak^{-/-} cells (Leu *et al.*, 2004). This suggests that, during apoptosis, the level of mitochondrial p53 depends on the presence of Bcl-2 family members able to anchor the tumor suppressor at the OMM.

It would be promising to counteract the overexpression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in order to render cancer cells more vulnerable to treatments. ABT-737, a small-molecule inhibitor of the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xl and Bcl-w (Oltersdorf *et*

al., 2005); (-)-gossypol, a natural product isolated from cotton seeds and roots, that binds to Bcl-2 and Bcl-xl (Wang *et al.*, 2006); and GX15-070 (obatoclax), a BH3 mimetic inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 proteins (Goy *et al.*, 2014), are currently undergoing clinical trials (Liu and Wang, 2012). In cancer cells that conserve a wild type version of the tumor suppressor, these molecules could enhance the mitochondrial activity of p53 by preventing its sequestration by anti-apoptotic Bcl-2 family members.

Acknowledgements

This work was supported by “Fonds de la Recherche Scientifique” grant from the Belgian National Fund for Scientific Research (FRS-FNRS). AS Silva Gallardo is a grant holder of the FRiA (FRS-FNRS, Belgium).

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Discussion générale

Dans cette dernière partie, l'objectif et les résultats obtenus au cours de cette thèse seront discutés dans un contexte plus général. Des idées d'approfondissement seront proposées pour certains groupes de résultats présentés.

1. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, éléments pro-oncogéniques.

A ce jour, il est établi que les six protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bcl-B, Bfl-1 et Mcl-1) peuvent favoriser le développement ou la progression du cancer et contribuer à la résistance thérapeutique. Cette protection varie cependant grandement en fonction du type de cancer, ainsi que suivant le membre anti-apoptotique surexprimé. De nombreux aspects doivent être pris en considération afin de déterminer ceux qui sont essentiels à la protection de la cellule cancéreuse. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer : les interactions protéiques intra-membres de la famille Bcl-2, leur temps de demi-vie, leur niveau d'expression, les interactions spécifiques des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 avec d'autres régulateurs de la mort cellulaire, leur localisation subcellulaire et leur conformation.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet protecteur des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur les cellules cancéreuses, dans le cas d'une apoptose induite par

Discussion générale

Après avoir établi ces interactions, nous avons réalisé de nouvelles expériences afin de déterminer quels membres sont capables d'inhiber l'apoptose des cellules cancéreuses. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des agents connus pour induire une apoptose dépendante de p53 : la doxorubicine, la nutline-3a et les UV-B (Drakos *et al.*, 2011; Kojima *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2014a; Yang *et al.*, 2013). Nous avons établi que Bcl-2 et Bfl-1 protégeaient significativement la cellule contre ces facteurs tandis que Bcl-w n'octroyait aucune protection significative (Figure 1).

2. Aspects déterminants dans le potentiel anti-apoptotique

Outre la présente thèse, les capacités relatives des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 à protéger la cellule contre des thérapies anti-cancéreuses ont été examinées par Rooswinkel et son équipe, en 2014 (Rooswinkel *et al.*, 2014). En effet, ils ont réalisé des lignées cellulaires J16 stables qui surexpriment les différents membres anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-B et Mcl-1 à des niveaux d'ARNm comparables. Puis, ces lignées ont été traitées avec des radiations, des inhibiteurs de topoisomérase (daunorubicine et étoposide), une toxine des microtubules (vincristine), un inhibiteur de kinase cycline-dépendante (roscovitine), un inhibiteur du protéasome (bortézomibe) et le ligand de mort TRAIL. L'inhibiteur de kinase staurosporine a été utilisé comme contrôle pro-apoptotique (Rooswinkel *et al.*, 2014).

Les résultats indiquent que Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w protègent mieux les cellules leucémiques que Bcl-B, Bfl-1 ou Mcl-1 contre cette série de traitements. Ces données diffèrent de celles que nous avons obtenues. En effet, dans notre cas, nous observons que Bcl-2 et Bfl-1 diminuent significativement la cytotoxicité des agents utilisés, ce qui n'est pas le cas de Bcl-w. A titre d'exemple, Rooswinkel et son équipe rapportent que Bfl-1 n'offre pas de protection marquée en présence d'étoposide, inhibiteur de la topoisomérase II. Par contre, en présence du même agent, Bcl-2 et Bcl-w montrent un effet protecteur marqué et très similaire, l'un par rapport à l'autre. Nous pouvons supposer que la différence observée entre leurs résultats et les nôtres est liée au type cellulaire utilisé. En effet, les expériences de Rooswinkel ont été réalisées sur des cellules humaines J16 (Jurkat T-acute lymphoblastic

leukemia) tandis que nous avons utilisé les cellules d'ostéosarcome humain U2OS et de tétatocarcinome ovarien humain PA1. Il serait intéressant de connaître les altérations génétiques de ces lignées cancéreuses. Des différences entre elles pourraient expliquer davantage les divergences observées entre les résultats de Rooswinkel et ceux de la présente thèse. Les agents cytotoxiques utilisés sont également différents dans les deux études.

	Bad	Bid	Bik	Bim	Bmf	Hrk	Noxa	Puma	Bak	Bax	M
Bcl-2	1 2 29 33 8 11 18 39 34	1 2 29 33 8 46 50 6	1 2 29 33 8 23 38 46	1 2 29 33 8 27 40 6	1 2 33 8 9 11 51	1 2 33 26	1 2 29 58	1 2 33 8 6	16 33 65 4 16 39 46	33 57 4 8 17 39	1 2 3 4
Bcl-w	1 2 33 56 25 37 63 24 34	1 2 33 6	1 2 33 25	1 2 33 41 8 41 49 62	1 2 33 11 46	1 2 33 26	1 2 33 58	1 2 33 8 6	16 33 65 4 16 39 46	33 57 4 8 17 39	1 2 3 4
Bcl-xL	1 2 3 33 15 5 18 38 13 14 74 70	1 2 3 33 8 5 50 6	1 2 3 33 23 60	1 2 3 33 8 5 27 40	1 2 3 33 9 11 59	1 2 3 33 28 38	1 2 3 33 30 5 6	1 2 3 33 20 6	16 27 33 65 4 5 16 60	33 57 4 8 17 42	1 2 3 4
Bcl-B	1 2 33 54 25 63 54	1 2 33 54 43 44	1 2 33 54 25	1 2 33 52	1 2 33 54 54	1 2 33 54 26	1 2 33 54 74	1 2 33 54 54	33 54 65 4 12 33 44	33 57 4 8 17 42	1 2 3 4
Bfl-1	1 2 3 33 30 5 32	1 2 3 33 8 5 64 6	1 2 3 33 22	1 2 3 33 7 5 8	1 2 3 33 32 6	1 2 3 33 26	1 2 3 33 7 5 16 12	1 2 3 33 20 60 6	16 33 48 65 4 5 16 60	33 57 4 8 17 57	1 2 3 4
Mcl-1											

Tableau 1 : Interactions protéiques entre les membres de la famille de Bcl-2, suivant les données de la littérature. Les interactions reportées sont catégorisées suivant la méthodologie employée (M) pour démontrer cette interaction, comme indiqué par les chiffres dans la colonne de droite. Les catégories sont (1) mesure d'affinité in vitro, utilisant des peptides comprenant le domaine BH3 et les membres antiapoptotiques de la famille Bcl-2 dépourvus du C-terminal ; (2) immunoprécipitations à partir de cellules exprimant de façon exogène les protéines de la famille de Bcl-2 ; (3) immunoprécipitations à partir de cellules exprimant de façon endogène les protéines de la famille de Bcl-2 ; (4) résonance magnétique nucléaire et structures cristallines avec des protéines recombinantes ou bien mesures biophysiques de l'interaction entre les protéines complètes. Les cases pour chaque paire de protéines de la famille Bcl-2 sont colorées suivant un code de couleur correspondant à l'intensité d'interaction. Le chiffre présent dans chaque case réfère à la publication pertinente, citée dans la Table 1 supplémentaire de la publication de Rooswinkel (Rooswinkel *et al.*, 2014).

Le profil d'interaction de chacun des six membres anti-apoptotiques avec les membres pro-apoptotiques de cette même famille a également été établi dans cette étude (Rooswinkel *et al.*,

Discussion générale

2014), (Tableau 1). Selon ces auteurs, plus important que les interactions protéiques avec les autres membres de la famille de Bcl-2, c'est le temps de demi-vie des protéines anti-apoptotiques qui détermine leur potentiel protecteur au sein des cellules cancéreuses. En ce qui concerne leur profil d'interaction, Bcl-2 et Bcl-w sont relativement proches, tandis que celui de Bfl-1 varie de celui de Bcl-2 (Rooswinkel *et al.*, 2014). Nos résultats indiquent que Bcl-2 et Bfl-1 protègent de manière importante les lignées PA1 et U2OS contre respectivement la doxorubicine et le rayonnement UV-B. Par contre, Bcl-w n'exerce pas de protection marquée. Cela suggérerait que le profil d'interaction protéique intra-famille Bcl-2 n'est pas le seul facteur déterminant le potentiel anti-apoptotique de ces protéines pro-survie.

Un autre aspect abordé par l'équipe de Rooswinkel est celui de la durée de demi-vie. En effet, le temps de demi-vie varie grandement au sein des protéines de la famille Bcl-2. Ainsi, Mcl-1 et Bfl-1 sont des protéines peu stables, contrairement à Bcl-2 et Bcl-xl (Juin *et al.*, 2013). Nos résultats mettent en avant Bcl-2 et Bfl-1 comme agents protecteurs, mais leur durée de demi-vie est très différente : celle de Bfl-1 (~3 à 4 heures (Moulding *et al.*, 2001; Rooswinkel *et al.*, 2014)) est considérablement plus courte que celle de Bcl-2 et Bcl-w (~20 heures (Blagosklonny *et al.*, 1996; Rooswinkel *et al.*, 2014)). Bcl-B, Bfl-1 et Mcl-1 subissent une importante dégradation protéasomale normale ou induite par les traitements (Rooswinkel *et al.*, 2014). De plus, clivés en des sites spécifiques, Bfl-1 et Mcl-1 peuvent être converties en des protéines pro-apoptotiques (Kucharczak *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005).

Il est très probable que le temps de demi-vie de ces protéines, qui de plus peut varier en présence de stress, influe sur leur activité anti-apoptotique et leur rôle protecteur. Ce point n'a pas été abordé au sein de notre étude, dans le sens où nous avons utilisé des systèmes d'expression « forcée » de ces membres, que ce soit de manière constitutive ou inducible. Pour étudier l'impact du temps de demi-vie de ces protéines sur leur activité, en présence de stimuli apoptotiques, il faudrait s'intéresser à la protéine endogène et à ses variations de niveau en cours de traitement.

2.1. Interactions avec le suppresseur de tumeur p53

Ainsi, il est envisageable que les interactions protéiques intra-membres de la famille Bcl-2 ne soient pas le seul facteur déterminant leur potentiel anti-apoptotique. Dans le cadre de cette thèse, ce sont les interactions spécifiques de ces protéines avec le régulateur de la mort cellulaire p53 qui sont prises en considération. Nous avons démontré que Bcl-2 et Bfl-1 interagissent avec p53. De manière surprenante, Bcl-w interagit aussi avec p53 alors qu'il n'a pas de rôle protecteur visible en présence de doxorubicine, UV-B ou nutline-3a. Dès lors, ce sont les domaines d'interaction entre ces membres et le suppresseur de tumeur qui pourraient être importants.

Les affinités préférentielles de certaines protéines anti-apoptotiques, envers l'un ou l'autre site d'interaction au sein de la protéine p53, seraient essentielles au destin de la cellule. Cet aspect a déjà été discuté au second chapitre de la partie résultats de cette thèse. En résumé, il est probable que les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 qui interagissent avec le domaine de liaison à l'ADN de p53 empêchent le suppresseur de tumeur d'entraîner l'apoptose. En effet, le domaine de liaison à l'ADN comporte les résidus impliqués dans l'interaction et l'activation des membres effecteurs de l'apoptose Bax et Bak (Sot *et al.*, 2007). Dès lors, l'encombrement allostérique engendré par les membres anti-apoptotiques liés au DBD préviendrait l'interaction de p53 avec les membres effecteurs de l'apoptose, inhibant ainsi leur activation.

Il serait donc crucial, si nous voulons valider cette hypothèse, de déterminer les domaines de p53 impliqués dans l'interaction avec chacun des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. En cette matière, Bcl-w pourrait-il se démarquer de Bcl-2 et Bfl-1 ? Pour le découvrir, il faudrait caractériser les interactions. Nous pourrions dans un premier temps étudier les interactions entre une protéine anti-apoptotique d'une part, et les différents domaines de p53 individuellement d'autre part. Dans un second temps nous réaliserions des expériences de mutagenèse dirigée afin de déterminer les acides aminés critiques à cette interaction.

Discussion générale

Les interactions entre les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et le suppresseur de tumeur p53 peuvent être interprétées de deux façons. Dans un premier modèle, la liaison de p53 avec ces protéines contrebalance leur activité anti-apoptotique sur les membres effecteurs pro-apoptotiques de la famille, Bax et Bak (Mihara *et al.*, 2003). Dans un second modèle, **les complexes entre p53 et les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl participent plutôt à un mécanisme de séquestration qui inhibe les fonctions pro-apoptotiques mitochondriales de p53**. Cette inhibition entraverait notamment sa capacité d'induire l'oligomérisation de Bak et donc la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

Notons, à ce titre, que l'induction de l'apoptose a été corrélée avec la dissociation du complexe Bcl-xl-p53 plutôt qu'avec l'augmentation de ce complexe (Spierings *et al.*, 2005). Les résultats obtenus lors de cette thèse renforcent le second modèle. En effet, Bcl-2 et Bfl-1, agissant comme des ancrages pour p53, séquestre et empêcheraient ainsi les fonctions apoptotiques du suppresseur de tumeur.

La présence de p53 à la mitochondrie a été observée dans différentes cellules saines, issues d'organismes différents. Ces cellules n'étant pas en apoptose malgré la localisation mitochondriale de p53, une hypothèse a été émise concernant l'inactivité de p53 : p53 serait séquestré et inactivé à la mitochondrie (Ferecatu *et al.*, 2009). Notre hypothèse est en accord avec celle de Ferecatu et son équipe. En effet, dans une cellule saine, p53 pourrait être séquestré par un ou plusieurs membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 à la membrane mitochondriale externe. Dans ce cas, un niveau physiologique et endogène de ces protéines anti-apoptotiques (et non plus une surexpression comme dans le cas de notre étude) serait suffisant pour contrer le suppresseur de tumeur.

Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de traiter au moyen d'UV-B nos clones inductibles U2OS exprimant Bcl-2, afin d'induire p53, en présence ou non de la molécule ABT-199 inhibitrice de Bcl-2 (Souers *et al.*, 2013). Une fois le membre anti-apoptotique inhibé, si notre hypothèse est juste, l'apoptose dépendante de p53 serait augmentée. Alternativement, des expériences similaires

pourraient être envisagées sur les lignées cellulaires employées par Ferecatu et son équipe (Ferecatu *et al.*, 2009). Ces cellules comportent un certain niveau de p53 mitochondrial en absence de stress. Différentes molécules ciblant des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, comme Bcl-2 ou Bfl-1, pourraient induire dans ces cellules un processus apoptotique. Ces expériences nécessiteraient les contrôles appropriés afin de s'assurer que l'apoptose observée est dépendante du suppresseur de tumeur et nécessite bien son activité mitochondriale (et non transcriptionnelle). Pour ce faire, il serait possible d'utiliser un inhibiteur de la transcription d'une part et, d'autre part, de réaliser l'expérience en présence d'un inhibiteur de p53. En conjonction, des mitochondries purifiées pourraient être incubées en présence de p53 et de concentrations croissantes des différents membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Cela permettrait, dans un système *in vitro* simplifié, de déterminer lesquelles de ces protéines anti-apoptotiques préviennent l'oligomérisation de Bak et la PMME induite par p53.

2.2. Localisation subcellulaire et conformation

La localisation cellulaire et la conformation sont susceptibles d'influer sur la fonction des membres de la famille de Bcl-2 (Gross *et al.*, 1999). Ces deux aspects sont étroitement liés puisque la conformation influe également sur la localisation cellulaire. En effet, tant que leur C-terminal est séquestré, Bcl-xl et Bcl-w sont cytosoliques tandis qu'en présence d'un stress, ce domaine transmembranaire permet leur ancrage dans la membrane mitochondriale externe (Denisov *et al.*, 2003; Hinds *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 1994). La localisation cellulaire de Bcl-2 dans une cellule saine est exclusivement membranaire (Hockenbery *et al.*, 1990; Krajewski *et al.*, 1993). La localisation de Bfl-1 dans les mêmes conditions est essentiellement membranaire mais aussi cytosolique (Brien *et al.*, 2009; D'Sa-Eipper and Chinnadurai, 1998). Enfin, la localisation cellulaire de Bcl-w dans un contexte sain est exclusivement cytosolique (Denisov *et al.*, 2003; Hinds *et al.*, 2003). Cependant, en cas de stress, ces trois protéines résident au niveau d'une membrane cytosolique.

Discussion générale

Il est envisageable que la séquestration de p53 puisse avoir lieu dans différents compartiments cellulaires. Dans le cas d'une surexpression de Bcl-2, protéine membranaire de la membrane mitochondriale externe ainsi que de la membrane du réticulum endoplasmique, nous pouvons observer une augmentation de la translocation mitochondriale et cytosolique du suppresseur de tumeur. En ce qui concerne Bfl-1, qui a déjà été observé au niveau de la membrane mitochondriale externe ainsi qu'au niveau du réticulum endoplasmique, des données similaires ont été obtenues. Ces observations suggèrent une potentielle séquestration du suppresseur de tumeur dans différents compartiments. Il serait judicieux de réaliser un immunomarquage des protéines p53, Bcl-2 et Bfl-1. La technique de microscopie confocale permettrait ensuite d'observer une éventuelle co-localisation du suppresseur de tumeur avec ces membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, dans différents compartiments cellulaires.

3. Conclusions générales et perspectives

Ainsi, nous avons analysé les interactions protéiques intra-membres de la famille Bcl-2, les interactions spécifiques des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 avec p53, le temps de demi-vie, la localisation subcellulaire et la conformation des membres Bcl-2, Bfl-1 et Bcl-w. Parmi ces aspects, aucun ne révèle de caractéristiques communes à Bcl-2 et Bfl-1 tout en différant pour Bcl-w. Nous ne pouvons donc pas dégager de caractéristique générale sur les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 quant à leur capacité d'inhiber l'apoptose p53-dépendante.

Au terme de cette thèse, suivant l'hypothèse émise, une inhibition des membres Bcl-2 et Bfl-1 favoriserait l'activité pro-apoptotique mitochondriale du suppresseur de tumeur. Ceci est applicable en particulier pour les cellules cancéreuses qui montreraient un taux élevé de ces protéines. Des études en siRNA ont été publiées, indiquant que l'inhibition seule du gène *Bcl-2* entraîne une apoptose p53-dépendante massive, sans même recourir à son induction au moyen de dommages à l'ADN (Jiang and Milner, 2003). Ces études vont dans le sens de notre hypothèse, puisqu'elles démontrent l'effet inhibiteur inhérent de Bcl-2 pour p53.

Rappelons ici l'objectif initial de cette thèse : déterminer si un niveau élevé des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 pourrait avoir un effet négatif sur l'apoptose dépendante de p53. Autrement dit, cela peut-il compromettre de manière directe l'activité pro-apoptotique, et en particulier mitochondriale, de p53 sauvage ? Nous avons démontré que p53 interagit avec Bcl-2, Bcl-w et Bfl-1, et nous avons évalué l'impact d'une surexpression de ces membres sur l'apoptose induite par p53. Nous pouvons dès lors répondre à cette question par l'affirmative, nuancée cependant puisque une surexpression de Bcl-w n'entrave pas la voie apoptotique dépendante du suppresseur de tumeur. Ainsi, la surexpression de certains membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 peut contrecarrer l'activité de suppresseur de tumeur de p53. De plus, ces membres peuvent varier en fonction du type cellulaire (Rooswinkel *et al.*, 2014).

De nouvelles stratégies expérimentales sont aujourd'hui développées dans le but de réactiver p53 sauvage dans la cellule cancéreuse, notamment dans le cas de mélanome. En effet, dans 80% des mélanomes humains, p53 est maintenu à l'état sauvage dans la cellule. De nombreuses voies sont soupçonnées d'inhiber le suppresseur de tumeur : une surexpression de MDM2 et/ou MDM4, une dérégulation de l'expression des protéines de la famille ASPP (Apoptosis-Stimulation Protein of p53, comprenant ASPP1, ASPP2 et iASPP). A ce jour, il existe des molécules capables d'inhiber ces voies de façon à réactiver l'activité de p53 sauvage, permettant ainsi la régression de la tumeur. Ainsi, la nutline-3a inhibe MDM2, le SAH-p53-8 inhibe MDM4, le JNJ-7706621 inhibe iASPP (Lu *et al.*, 2014b).

Alternativement, dans le cas de cancers qui expriment une forme mutée du suppresseur de tumeur, une seconde stratégie vise à réactiver les mutants. Ainsi APR-246, molécule en phase clinique II, est connue pour induire l'expression des gènes Bax, Noxa et Puma. Administrée sous forme de pro-drogue, APR-246 devient du méthylène quinuclidinone (MQ), et lie de façon covalente les cystéines de p53 mutant et p53 sauvage. L'interaction de MQ avec p53 entraîne la réactivation des mutants et favorise le repliement correct de la protéine sauvage (Bykov and Wiman, 2014).

Discussion générale

La surexpression de Bcl-2 et Bfl-1 dans certains types de cancers a déjà été reportée dans la littérature. Ainsi, la surexpression de Bcl-2 a été observée dans de nombreux cancers humains tels que celui de la prostate, du colon, du poumon, de l'estomac, du rein, les neuroblastomes, les lymphomes non-Hodgkinien ainsi que les leucémies aiguës et chroniques. Une expression élevée de la protéine Bfl-1 a été constatée dans les tissus cancéreux humains de l'estomac (Kirkin *et al.*, 2004). Il est donc très intéressant de vérifier si ce type de cancer, où ces protéines sont surexprimées, possèdent ou non le gène *TP53* sauvage. Actuellement, il existe des bases de données (International Agency for Research on Cancer TP53 Database ; <http://p53.iarc.fr/>) qui compilent les lignées cellulaires utilisées en laboratoire et leurs caractéristiques, notamment l'intégrité ou non du gène codant pour le suppresseur de tumeur. Les informations regroupées pour les lignées cancéreuses du colon qui surexpriment Bcl-2, tels que CoLo320DM, LoVo et TCO-1 (Ayhan *et al.*, 1994) indiquent que la première lignée comprend la protéine p53 mutante, tandis que les deuxième et troisième lignées possèdent p53 sauvage. La même recherche menée sur les lignées cancéreuses gastriques surexprimant Bcl-2 (Ayhan *et al.*, 1994) indique que la lignée KATO-III ne possède pas de protéine p53, tandis que les lignées HSC-39 et MKN-28 possèdent des protéines p53 mutantes. Il est bien entendu illusoire de vouloir tirer des conclusions définitives sur la base de ces quelques lignées. Néanmoins, il serait intéressant d'approfondir ce type d'études de manière à déterminer si les cancers qui conservent p53 sauvage présentent communément une surexpression de Bcl-2 ou Bfl-1, vu que ces deux protéines lient p53 et sont capables d'atténuer son activité pro-apoptotique.

Le matériel créé dans le courant de ces cinq années est précieux pour un certain nombre d'applications qui pourraient compléter les résultats obtenus.

Ainsi, il serait possible de vérifier si l'oligomérisation de Bak ou la libération de cytochrome c induite par p53 sont inhibées par un niveau élevé d'un membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2. Pour ce faire, il faudrait incuber des mitochondries intactes issues de la lignée Saos 2 (p53^{-/-}) en présence de p53 sauvage (obtenu par transcription/traduction *in vitro*) et de concentrations croissantes de

chaque membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2. GST-Bcl-xl, GST-Bcl-w, GST-Bfl-1 ont déjà été obtenus pour les expériences de GST pull-down décrites dans cette thèse. Les protéines Bcl-2 et Mcl-1 qui n'ont pu être purifiées à partir de *E. coli* pourraient être obtenues par transcription/traduction *in vitro*, après avoir cloné leur cDNA dans le plasmide adéquat.

L'oligomérisation de Bak serait déterminée par Western blot, après *crosslinking* des protéines au moyen de BMH (bis-maleimido-hexane) (Leu *et al.*, 2004). Afin d'étudier la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, les différents échantillons seraient centrifugés en fin d'incubation de manière à sédimenter les mitochondries. La présence de cytochrome c serait ensuite mesurée dans le surnageant et dans le culot par Western blot. Ces expériences permettraient de valider dans un modèle *in vitro* simple et fiable les potentiels effets directs des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 sur l'activité mitochondriale de p53 (Leu *et al.*, 2004; Pietsch *et al.*, 2007).

D'un point de vue plus général, de nombreuses recherches restent ouvertes en ce qui concerne l'étude des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Notamment, la connaissance de leurs modifications post-traductionnelles pourraient apporter des informations majeures quant à la régulation de leur activité. Il a déjà été démontré que la déphosphorylation de Bcl-2 promeut la formation du complexe Bcl-2-p53 (Deng *et al.*, 2006). Etendre ce type de connaissance à tous les membres anti-apoptotiques permettrait de déterminer les modifications post-traductionnelles qui impactent sur leur capacité à lier p53.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Bibliographie

- Achanta, G., R. Sasaki, L. Feng, J. S. Carew, W. Lu, H. Pelicano, M. J. Keating, and P. Huang. 2005.** Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* **24**:3482-3492.
- Adams, J. M., and S. Cory. 2007.** The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**:1324-1337.
- Ahn, B. Y., D. L. Trinh, L. D. Zajchowski, B. Lee, A. N. Elwi, and S. W. Kim. 2010.** Tid1 is a new regulator of p53 mitochondrial translocation and apoptosis in cancer. *Oncogene* **29**:1155-1166.
- Anvekar, R. A., J. J. Asciolla, D. J. Missert, and J. E. Chipuk. 2011.** Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Front Oncol.* **1**.
- Ayhan, A., W. Yasui, H. Yokozaki, M. Seto, R. Ueda, and E. Tahara. 1994.** Loss of heterozygosity at the bcl-2 gene locus and expression of bcl-2 in human gastric and colorectal carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* **85**:584-591.
- Azad, A., J. Fox, S. Leverrier, and A. Storey. 2012.** Blockade of the BAK hydrophobic groove by inhibitory phosphorylation regulates commitment to apoptosis. *PLoS. One.* **7**:e49601.
- Bae, I. H., M. J. Park, S. H. Yoon, S. W. Kang, S. S. Lee, K. M. Choi, and H. D. Um. 2006.** Bcl-w promotes gastric cancer cell invasion by inducing matrix metalloproteinase-2 expression via phosphoinositide 3-kinase, Akt, and Sp1. *Cancer Res.* **66**:4991-4995.
- Bae, J., C. P. Leo, S. Y. Hsu, and A. J. Hsueh. 2000.** MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J. Biol. Chem.* **275**:25255-25261.
- Bakhanashvili, M., S. Grinberg, E. Bonda, A. J. Simon, S. Moshitch-Moshkovitz, and G. Rahav. 2008.** p53 in mitochondria enhances the accuracy of DNA synthesis. *Cell Death. Differ.* **15**:1865-1874.

- Baptiste, N., P. Friedlander, X. Chen, and C. Prives. 2002.** The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene* **21**:9-21.
- Bartholomeusz, G., Y. Wu, S. M. Ali, W. Xia, K. Y. Kwong, G. Hortobagyi, and M. C. Hung. 2006.** Nuclear translocation of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bok induces apoptosis. *Mol. Carcinog.* **45**:73-83.
- Bensaad, K., and K. H. Vousden. 2007.** p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol.* **17**:286-291.
- Beroukhi, R., C. H. Mermel, D. Porter, G. Wei, S. Raychaudhuri, J. Donovan, J. Barretina, J. S. Boehm, J. Dobson, M. Urashima, K. T. Mc Henry, R. M. Pinchback, A. H. Ligon, Y. J. Cho, L. Haery, H. Greulich, M. Reich, W. Winckler, M. S. Lawrence, B. A. Weir, K. E. Tanaka, D. Y. Chiang, A. J. Bass, A. Loo, C. Hoffman, J. Prensner, T. Liefeld, Q. Gao, D. Yecies, S. Signoretti, E. Maher, F. J. Kaye, H. Sasaki, J. E. Tepper, J. A. Fletcher, J. Tabernero, J. Baselga, M. S. Tsao, F. Demichelis, M. A. Rubin, P. A. Janne, M. J. Daly, C. Nucera, R. L. Levine, B. L. Ebert, S. Gabriel, A. K. Rustgi, C. R. Antonescu, M. Ladanyi, A. Letai, L. A. Garraway, M. Loda, D. G. Beer, L. D. True, A. Okamoto, S. L. Pomeroy, S. Singer, T. R. Golub, E. S. Lander, G. Getz, W. R. Sellers, and M. Meyerson. 2010.** The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**:899-905.
- Bessette, P. H., F. Aslund, J. Beckwith, and G. Georgiou. 1999.** Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:13703-13708.
- Beverly, L. J., and H. E. Varmus. 2009.** MYC-induced myeloid leukemogenesis is accelerated by all six members of the antiapoptotic BCL family. *Oncogene* **28**:1274-1279.
- Bingle, C. D., R. W. Craig, B. M. Swales, V. Singleton, P. Zhou, and M. K. Whyte. 2000.** Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *J. Biol. Chem.* **275**:22136-22146.

Bibliographie

- Bivik, C. A., P. K. Larsson, K. M. Kagedal, I. K. Rosdahl, and K. M. Ollinger. 2006.** UVA/B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members. *J. Invest Dermatol.* **126**:1119-1127.
- Blagosklonny, M. V., M. Alvarez, A. Fojo, and L. M. Neckers. 1996.** bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukemia cells. *Leuk. Res.* **20**:101-107.
- Blank, M., and Y. Shiloh. 2007.** Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* **6**:686-695.
- Borner, C., I. Martinou, C. Mattmann, M. Irmeler, E. Schaerer, J. C. Martinou, and J. Tschopp. 1994.** The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J. Cell Biol.* **126**:1059-1068.
- Bouillet, P., D. Metcalf, D. C. Huang, D. M. Tarlinton, T. W. Kay, F. Kontgen, J. M. Adams, and A. Strasser. 1999.** Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **286**:1735-1738.
- Bourdon, J. C., V. D. Laurenzi, G. Melino, and D. Lane. 2003.** p53: 25 years of research and more questions to answer. *Cell Death. Differ.* **10**:397-399.
- Braithwaite, A. W., and C. L. Prives. 2006.** p53: more research and more questions. *Cell Death. Differ.* **13**:877-880.
- Brash, D. E., J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin, and J. Ponten. 1991.** A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:10124-10128.
- Brien, G., A. L. Debaud, X. Robert, L. Oliver, M. C. Trescol-Biemont, N. Cauquil, O. Geneste, N. Aghajari, F. M. Vallette, R. Haser, and N. Bonnefoy-Berard. 2009.** C-terminal residues regulate localization and function of the antiapoptotic protein Bfl-1. *J. Biol. Chem.* **284**:30257-30263.

- Brooks, C. L., and W. Gu. 2006.** p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell* **21**:307-315.
- Brosh, R., and V. Rotter. 2009.** When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* **9**:701-713.
- Brown, C. J., S. Lain, C. S. Verma, A. R. Fersht, and D. P. Lane. 2009.** Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer* **9**:862-873.
- Burma, S., and D. J. Chen. 2004.** Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**:909-918.
- Bykov, V. J., and K. G. Wiman. 2014.** Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS Lett.*
- Caelles, C., A. Helmberg, and M. Karin. 1994.** p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* **370**:220-223.
- Campbell, H. G., R. Mehta, A. A. Neumann, C. Rubio, M. Baird, T. L. Slatter, and A. W. Braithwaite. 2013.** Activation of p53 following ionizing radiation, but not other stressors, is dependent on the proline-rich domain (PRD). *Oncogene* **32**:827-836.
- Cao, X. X., I. Mohuiddin, F. Ece, D. J. McConkey, and W. R. Smythe. 2001.** Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**:562-568.
- Capuco, A. V., M. Li, E. Long, S. Ren, K. S. Hruska, K. Schorr, and P. A. Furth. 2002.** Concurrent pregnancy retards mammary involution: effects on apoptosis and proliferation of the mammary epithelium after forced weaning of mice. *Biol. Reprod.* **66**:1471-1476.
- Carter, S., O. Bischof, A. Dejean, and K. H. Vousden. 2007.** C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat. Cell Biol.* **9**:428-435.
- Cartlidge, R. A., G. R. Thomas, S. Cagnol, K. A. Jong, S. A. Molton, A. J. Finch, and M. McMahon. 2008.** Oncogenic BRAF(V600E) inhibits

Bibliographie

BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**:534-544.

Carvalho, J. W., F. R. Alves, T. Batista, F. A. Carvalho, P. S. Santiago, and M. Tabak. 2013. Sodium dodecyl sulfate (SDS) effect on the thermal stability of oxy-HbGp: Dynamic light scattering (DLS) and small angle X-ray scattering (SAXS) studies. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **111**:561-570.

Catherine Staudt. 2010. Régulation de l'activité pro-apoptotique de p53 à la mitochondrie par les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2.

Certo, M., G. M. Del, V. M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S. A. Armstrong, and A. Letai. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**:351-365.

Chang, B. S., A. J. Minn, S. W. Muchmore, S. W. Fesik, and C. B. Thompson. 1997. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J.* **16**:968-977.

Chen, D., Z. Yu, Z. Zhu, and C. D. Lopez. 2006. The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* **66**:3485-3494.

Chen, L., S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C. L. Day, J. M. Adams, and D. C. Huang. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17**:393-403.

Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, and J. M. Hardwick. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**:1966-1968.

Cheng, E. H., T. V. Sheiko, J. K. Fisher, W. J. Craigen, and S. J. Korsmeyer. 2003. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**:513-517.

- Cheng, Q., H. H. Lee, Y. Li, T. P. Parks, and G. Cheng. 2000.** Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition. *Oncogene* **19**:4936-4940.
- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, T. Kuwana, D. D. Newmeyer, and D. R. Green. 2005.** PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* **309**:1732-1735.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler, and D. R. Green. 2004.** Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**:1010-1014.
- Chipuk, J. E., U. Maurer, D. R. Green, and M. Schuler. 2003.** Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* **4**:371-381.
- Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M. J. Parsons, and D. R. Green. 2010.** The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* **37**:299-310.
- Cho, Y., S. Gorina, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich. 1994.** Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**:346-355.
- Choi, S. S., I. C. Park, J. W. Yun, Y. C. Sung, S. I. Hong, and H. S. Shin. 1995.** A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene* **11**:1693-1698.
- Clem, R. J., E. H. Cheng, C. L. Karp, D. G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M. B. Kastan, D. E. Griffin, W. C. Earnshaw, M. A. Veluona, and J. M. Hardwick. 1998.** Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:554-559.
- Costanzo, A., N. Pediconi, A. Narcisi, F. Guerrieri, L. Belloni, F. Fausti, E. Botti, and M. Levrero. 2014.** TP63 and TP73 in cancer, an unresolved "family" puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS Lett.*

Bibliographie

- Craig, R. W. 2002.** MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* **16**:444-454.
- Cuconati, A., C. Mukherjee, D. Perez, and E. White. 2003.** DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev.* **17**:2922-2932.
- Czabotar, P. E., E. F. Lee, M. F. van Delft, C. L. Day, B. J. Smith, D. C. Huang, W. D. Fairlie, M. G. Hinds, and P. M. Colman. 2007.** Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:6217-6222.
- Czabotar, P. E., G. Lessene, A. Strasser, and J. M. Adams. 2014.** Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**:49-63.
- D'Sa-Eipper, C., and G. Chinnadurai. 1998.** Functional dissection of Bfl-1, a Bcl-2 homolog: anti-apoptosis, oncogene-cooperation and cell proliferation activities. *Oncogene* **16**:3105-3114.
- Davenport, V., J. F. Morris, R. Motazed, and A. C. Chu. 1999.** p53 induction in normal human skin in vitro following exposure to solar simulated UV and UV-B irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B* **49**:177-186.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal. 2002.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**:949-954.
- Day, C. L., L. Chen, S. J. Richardson, P. J. Harrison, D. C. Huang, and M. G. Hinds. 2005.** Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J. Biol. Chem.* **280**:4738-4744.

- Day, C. L., C. Smits, F. C. Fan, E. F. Lee, W. D. Fairlie, and M. G. Hinds. 2008.** Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J. Mol. Biol.* **380**:958-971.
- Degterev, A., A. Lugovskoy, M. Cardone, B. Mulley, G. Wagner, T. Mitchison, and J. Yuan. 2001.** Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat. Cell Biol.* **3**:173-182.
- Deng, X., F. Gao, T. Flagg, J. Anderson, and W. S. May. 2006.** Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol. Cell Biol.* **26**:4421-4434.
- Deng, X., F. Gao, T. Flagg, and W. S. May, Jr. 2004.** Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:153-158.
- Denisov, A. Y., M. S. Madiraju, G. Chen, A. Khadir, P. Beauparlant, G. Attardo, G. C. Shore, and K. Gehring. 2003.** Solution structure of human BCL-w: modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J. Biol. Chem.* **278**:21124-21128.
- Derenne, S., B. Monia, N. M. Dean, J. K. Taylor, M. J. Rapp, J. L. Harousseau, R. Bataille, and M. Amiot. 2002.** Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* **100**:194-199.
- Deverman, B. E., B. L. Cook, S. R. Manson, R. A. Niederhoff, E. M. Langer, I. Rosova, L. A. Kulans, X. Fu, J. S. Weinberg, J. W. Heinecke, K. A. Roth, and S. J. Weintraub. 2002.** Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* **111**:51-62.
- Dewson, G., T. Kratina, P. Czabotar, C. L. Day, J. M. Adams, and R. M. Kluck. 2009.** Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol. Cell* **36**:696-703.
- Dewson, G., T. Kratina, H. W. Sim, H. Puthalakath, J. M. Adams, P. M. Colman, and R. M. Kluck. 2008.** To trigger apoptosis, Bak exposes

Bibliographie

its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol. Cell* **30**:369-380.

Drakos, E., R. R. Singh, G. Z. Rassidakis, E. Schlette, J. Li, F. X. Claret, R. J. Ford, Jr., F. Vega, and L. J. Medeiros. 2011. Activation of the p53 pathway by the MDM2 inhibitor nutlin-3a overcomes BCL2 overexpression in a preclinical model of diffuse large B-cell lymphoma associated with t(14;18)(q32;q21). *Leukemia* **25**:856-867.

Dumont, P., J. I. Leu, A. C. Della Pietra, D. L. George, and M. Murphy. 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* **33**:357-365.

Dutta, S., S. Gulla, T. S. Chen, E. Fire, R. A. Grant, and A. E. Keating. 2010. Determinants of BH3 binding specificity for Mcl-1 versus Bcl-xL. *J. Mol. Biol.* **398**:747-762.

Echeverry, N., D. Bachmann, F. Ke, A. Strasser, H. U. Simon, and T. Kaufmann. 2013. Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death. Differ.* **20**:785-799.

Efeyan, A., and M. Serrano. 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* **6**:1006-1010.

Emi, M., R. Kim, K. Tanabe, Y. Uchida, and T. Toge. 2005. Targeted therapy against Bcl-2-related proteins in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **7**:R940-R952.

Endo, H., H. Kamada, C. Nito, T. Nishi, and P. H. Chan. 2006. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci.* **26**:7974-7983.

Erster, S., M. Mihara, R. H. Kim, O. Petrenko, and U. M. Moll. 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**:6728-6741.

- Erster, S., and U. M. Moll. 2005.** Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**:843-850.
- Essmann, F., S. Pohlmann, B. Gillissen, P. T. Daniel, K. Schulze-Osthoff, and R. U. Janicke. 2005.** Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**:37169-37177.
- Estaquier, J., F. Vallette, J. L. Vayssiere, and B. Mignotte. 2012.** The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **942**:157-183.
- Fadeel, B., and S. Orrenius. 2005.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* **258**:479-517.
- Falck, J., N. Mailand, R. G. Syljuasen, J. Bartek, and J. Lukas. 2001.** The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**:842-847.
- Fecker, L. F., C. C. Geilen, G. Tchernev, U. Trefzer, C. Assaf, B. M. Kurbanov, C. Schwarz, P. T. Daniel, and J. Eberle. 2006.** Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J. Invest Dermatol.* **126**:1366-1371.
- Ferecatu, I., M. Bergeaud, A. Rodriguez-Enfedaque, F. N. Le, L. Oliver, V. Rincheval, F. Renaud, F. M. Vallette, B. Mignotte, and J. L. Vayssiere. 2009.** Mitochondrial localization of the low level p53 protein in proliferative cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**:772-777.
- Fesik, S. W. 2000.** Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* **103**:273-282.
- Fire, E., S. V. Gulla, R. A. Grant, and A. E. Keating. 2010.** Mcl-1-Bim complexes accommodate surprising point mutations via minor structural changes. *Protein Sci.* **19**:507-519.

Bibliographie

- Fox, J. L., F. Ismail, A. Azad, N. Ternette, S. Leverrier, M. J. Edelmann, B. M. Kessler, I. M. Leigh, S. Jackson, and A. Storey. 2010.** Tyrosine dephosphorylation is required for Bak activation in apoptosis. *EMBO J.* **29**:3853-3868.
- Fridman, J. S., and S. W. Lowe. 2003.** Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**:9030-9040.
- Fuchs, Y., and H. Steller. 2011.** Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**:742-758.
- Fujise, K., D. Zhang, J. Liu, and E. T. Yeh. 2000.** Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **275**:39458-39465.
- Fukuchi, Y., M. Kizaki, K. Yamato, C. Kawamura, A. Umezawa, J. Hata, T. Nishihara, and Y. Ikeda. 2001.** Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene* **20**:704-713.
- Fuster, J. J., S. M. Sanz-Gonzalez, U. M. Moll, and V. Andres. 2007.** Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol. Med.* **13**:192-199.
- Gao, S., W. Fu, M. Durrenberger, G. C. De, and H. Zhang. 2005.** Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell Mol. Life Sci.* **62**:1015-1024.
- Gartel, A. L., and S. K. Radhakrishnan. 2005.** Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* **65**:3980-3985.
- Gavathiotis, E., M. Suzuki, M. L. Davis, K. Pitter, G. H. Bird, S. G. Katz, H. C. Tu, H. Kim, E. H. Cheng, N. Tjandra, and L. D. Walensky. 2008.** BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**:1076-1081.
- Germain, M., A. P. Nguyen, J. N. Le Grand, N. Arbour, J. L. Vanderluit, D. S. Park, J. T. Opferman, and R. S. Slack. 2011.** MCL-1 is a stress sensor that regulates autophagy in a developmentally regulated manner. *EMBO J.* **30**:395-407.

- Giannakakou, P., D. L. Sackett, Y. Ward, K. R. Webster, M. V. Blagosklonny, and T. Fojo. 2000.** p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat. Cell Biol.* **2**:709-717.
- Gibson, L., S. P. Holmgreen, D. C. Huang, O. Bernard, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, G. R. Sutherland, E. Baker, J. M. Adams, and S. Cory. 1996.** bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* **13**:665-675.
- Godefroy, N., C. Lemaire, F. Renaud, V. Rincheval, S. Perez, I. Parvu-Ferecatu, B. Mignotte, and J. L. Vayssiere. 2004.** p53 can promote mitochondria- and caspase-independent apoptosis. *Cell Death. Differ.* **11**:785-787.
- Goldsmith, K. C., M. Gross, S. Peirce, D. Luyindula, X. Liu, A. Vu, M. Sliozberg, R. Guo, H. Zhao, C. P. Reynolds, and M. D. Hogarty. 2012.** Mitochondrial Bcl-2 family dynamics define therapy response and resistance in neuroblastoma. *Cancer Res.* **72**:2565-2577.
- Goldstein, N. B., W. U. Johannes, A. V. Gadeliya, M. R. Green, M. Fujita, D. A. Norris, and Y. G. Shellman. 2009.** Active N-Ras and B-Raf inhibit anoikis by downregulating Bim expression in melanocytic cells. *J. Invest Dermatol.* **129**:432-437.
- Gottifredi, V., and C. Prives. 2001.** Molecular biology. Getting p53 out of the nucleus. *Science* **292**:1851-1852.
- Goy, A., F. Hernandez-Ilizaliturri, B. Kahl, P. Ford, E. Protomastro, and M. Berger. 2014.** A phase I/II study of the pan Bcl-2 inhibitor obatoclax mesylate plus bortezomib for relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma.*
- Green, D. R., and G. Kroemer. 2005.** Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *J. Clin. Invest* **115**:2610-2617.
- Green, D. R., and G. Kroemer. 2009.** Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**:1127-1130.

Bibliographie

- Gross, A., J. Jockel, M. C. Wei, and S. J. Korsmeyer. 1998.** Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* **17**:3878-3885.
- Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. 1999.** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**:1899-1911.
- Grossman, S. R., M. E. Deato, C. Brignone, H. M. Chan, A. L. Kung, H. Tagami, Y. Nakatani, and D. M. Livingston. 2003.** Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* **300**:342-344.
- Ha, J. H., J. S. Shin, M. K. Yoon, M. S. Lee, F. He, K. H. Bae, H. S. Yoon, C. K. Lee, S. G. Park, Y. Muto, and S. W. Chi. 2013.** Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *J. Biol. Chem.* **288**:7387-7398.
- Hagn, F., C. Klein, O. Demmer, N. Marchenko, A. Vaseva, U. M. Moll, and H. Kessler. 2010.** BclxL changes conformation upon binding to wild-type but not mutant p53 DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* **285**:3439-3450.
- Hajduk, P. J. 2006.** SAR by NMR: putting the pieces together. *Mol. Interv.* **6**:266-272.
- Hamasaki, A., F. Sendo, K. Nakayama, N. Ishida, I. Negishi, K. Nakayama, and S. Hatakeyama. 1998.** Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J. Exp. Med.* **188**:1985-1992.
- Han, J., L. A. Goldstein, B. R. Gastman, A. Rabinovitz, and H. Rabinowich. 2005.** Disruption of Mcl-1.Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**:16383-16392.
- Han, J., L. A. Goldstein, W. Hou, B. R. Gastman, and H. Rabinowich. 2010.** Regulation of mitochondrial apoptotic events by p53-mediated disruption of complexes between antiapoptotic Bcl-2 members and Bim. *J. Biol. Chem.* **285**:22473-22483.

- Han, M. K., E. K. Song, Y. Guo, X. Ou, C. Mantel, and H. E. Broxmeyer. 2008.** SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* **2**:241-251.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Hangen, E., K. Blomgren, P. Benit, G. Kroemer, and N. Modjtahedi. 2010.** Life with or without AIF. *Trends Biochem. Sci.* **35**:278-287.
- Haupt, Y., S. Rowan, E. Shaulian, K. H. Vousden, and M. Oren. 1995.** Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* **9**:2170-2183.
- Heo, K. S., H. Lee, P. Nigro, T. Thomas, N. T. Le, E. Chang, C. McClain, C. A. Reinhart-King, M. R. King, B. C. Berk, K. Fujiwara, C. H. Woo, and J. Abe. 2011.** PKCzeta mediates disturbed flow-induced endothelial apoptosis via p53 SUMOylation. *J. Cell Biol.* **193**:867-884.
- Herman, M. D., T. Nyman, M. Welin, L. Lehtio, S. Flodin, L. Tresaugues, T. Kotenyova, A. Flores, and P. Nordlund. 2008.** Completing the family portrait of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: crystal structure of human Bfl-1 in complex with Bim. *FEBS Lett.* **582**:3590-3594.
- Hernlund, E., O. Kutuk, H. Basaga, S. Linder, T. Panaretakis, and M. Shoshan. 2009.** Cisplatin-induced nitrosylation of p53 prevents its mitochondrial translocation. *Free Radic. Biol. Med.* **46**:1607-1613.
- Hinds, M. G., and C. L. Day. 2005.** Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:690-699.
- Hinds, M. G., M. Lackmann, G. L. Skea, P. J. Harrison, D. C. Huang, and C. L. Day. 2003.** The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.* **22**:1497-1507.
- Hockenbery, D., G. Nunez, C. Millman, R. D. Schreiber, and S. J. Korsmeyer. 1990.** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**:334-336.

Bibliographie

- Hoelzinger, D. B., L. Mariani, J. Weis, T. Woyke, T. J. Berens, W. S. McDonough, A. Sloan, S. W. Coons, and M. E. Berens. 2005.** Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia*. **7**:7-16.
- Hoffman, W. H., S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen, and M. Murphy. 2002.** Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.* **277**:3247-3257.
- Hoh, J., S. Jin, T. Parrado, J. Edington, A. J. Levine, and J. Ott. 2002.** The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:8467-8472.
- Hsu, S. Y., and A. J. Hsueh. 1998.** A splicing variant of the Bcl-2 member Bok with a truncated BH3 domain induces apoptosis but does not dimerize with antiapoptotic Bcl-2 proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **273**:30139-30146.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, E. McGee, M. Lomeli, and A. J. Hsueh. 1997a.** Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:12401-12406.
- Hsu, Y. T., K. G. Wolter, and R. J. Youle. 1997b.** Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**:3668-3672.
- Igney, F. H., and P. H. Krammer. 2002.** Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**:277-288.
- Inohara, N., D. Ekhterae, I. Garcia, R. Carrio, J. Merino, A. Merry, S. Chen, and G. Nunez. 1998.** Mtd, a novel Bcl-2 family member activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-XL. *J. Biol. Chem.* **273**:8705-8710.
- Jeffrey, P. D., S. Gorina, and N. P. Pavletich. 1995.** Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* **267**:1498-1502.

- Jeong, S. Y., B. Gaume, Y. J. Lee, Y. T. Hsu, S. W. Ryu, S. H. Yoon, and R. J. Youle. 2004.** Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *EMBO J.* **23**:2146-2155.
- Jiang, G., Y. Q. Liu, Z. P. Wei, D. S. Pei, L. J. Mao, and J. N. Zheng. 2010.** Enhanced anti-tumor activity by the combination of a conditionally replicating adenovirus mediated interleukin-24 and dacarbazine against melanoma cells via induction of apoptosis. *Cancer Lett.* **294**:220-228.
- Jiang, M., and J. Milner. 2003.** Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes Dev.* **17**:832-837.
- Jiang, W., H. N. Ananthaswamy, H. K. Muller, and M. L. Kripke. 1999.** p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* **18**:4247-4253.
- Jiang, X., and X. Wang. 2004.** Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:87-106.
- Jin, Z., and W. S. El-Deiry. 2005.** Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* **4**:139-163.
- Joerger, A. C., S. Rajagopalan, E. Natan, D. B. Veprintsev, C. V. Robinson, and A. R. Fersht. 2009.** Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**:17705-17710.
- Johnson, T. M., K. Meade, N. Pathak, M. R. Marques, and L. D. Attardi. 2008.** Knockin mice expressing a chimeric p53 protein reveal mechanistic differences in how p53 triggers apoptosis and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:1215-1220.
- Jourdain, A., and J. C. Martinou. 2009.** Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**:1884-1889.
- Juin, P., P. F. Cartron, and F. M. Vallette. 2005.** Activation of Bax by BH3 domains during apoptosis: the unfolding of a deadly plot. *Cell Cycle* **4**:637-642.

Bibliographie

- Juin, P., O. Geneste, F. Gautier, S. Depil, and M. Campone. 2013.** Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **13**:455-465.
- Kakudo, Y., H. Shibata, K. Otsuka, S. Kato, and C. Ishioka. 2005.** Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res.* **65**:2108-2114.
- Kang, M. H., and C. P. Reynolds. 2009.** Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **15**:1126-1132.
- Karsan, A., E. Yee, K. Kaushansky, and J. M. Harlan. 1996.** Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood* **87**:3089-3096.
- Kastan, M. B., and D. S. Lim. 2000.** The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:179-186.
- Kaufmann, S. H., J. E. Karp, P. A. Svingen, S. Krajewski, P. J. Burke, S. D. Gore, and J. C. Reed. 1998.** Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood* **91**:991-1000.
- Kawaguchi, Y., A. Ito, E. Appella, and T. P. Yao. 2006.** Charge modification at multiple C-terminal lysine residues regulates p53 oligomerization and its nucleus-cytoplasm trafficking. *J. Biol. Chem.* **281**:1394-1400.
- Ke, F., A. Voss, J. B. Kerr, L. A. O'Reilly, L. Tai, N. Echeverry, P. Bouillet, A. Strasser, and T. Kaufmann. 2012.** BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice. *Cell Death. Differ.* **19**:915-925.
- Ke, N., A. Godzik, and J. C. Reed. 2001.** Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J. Biol. Chem.* **276**:12481-12484.
- Kenny, J. J., T. J. Knobloch, M. Augustus, K. C. Carter, C. A. Rosen, and J. C. Lang. 1997.** GRS, a novel member of the Bcl-2 gene family, is highly expressed in multiple cancer cell lines and in normal leukocytes. *Oncogene* **14**:997-1001.

- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**:239-257.
- Khan, S. B., T. Maududi, K. Barton, J. Ayers, and S. Alkan. 2004. Analysis of histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), effect on multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **125**:156-161.
- Kirkin, V., S. Joos, and M. Zornig. 2004. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**:229-249.
- Kirsch, D. G., A. Doseff, B. N. Chau, D. S. Lim, N. C. de Souza-Pinto, R. Hansford, M. B. Kastan, Y. A. Lazebnik, and J. M. Hardwick. 1999. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **274**:21155-21161.
- Kitada, S., M. Leone, S. Sareth, D. Zhai, J. C. Reed, and M. Pellecchia. 2003. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J. Med. Chem.* **46**:4259-4264.
- Kitada, S., I. M. Pedersen, A. D. Schimmer, and J. C. Reed. 2002. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* **21**:3459-3474.
- Knudson, C. M., K. S. Tung, W. G. Tourtellotte, G. A. Brown, and S. J. Korsmeyer. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**:96-99.
- Kojima, K., M. Konopleva, T. McQueen, S. O'Brien, W. Plunkett, and M. Andreeff. 2006. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **108**:993-1000.
- Kolluri, S. K., X. Zhu, X. Zhou, B. Lin, Y. Chen, K. Sun, X. Tian, J. Town, X. Cao, F. Lin, D. Zhai, S. Kitada, F. Luciano, E. O'Donnell, Y. Cao, F. He, J. Lin, J. C. Reed, A. C. Satterthwait, and X. K. Zhang. 2008. A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer Cell* **14**:285-298.

Bibliographie

- Konopleva, M., R. Contractor, T. Tsao, I. Samudio, P. P. Ruvolo, S. Kitada, X. Deng, D. Zhai, Y. X. Shi, T. Sneed, M. Verhaegen, M. Soengas, V. R. Ruvolo, T. McQueen, W. D. Schober, J. C. Watt, T. Jiffar, X. Ling, F. C. Marini, D. Harris, M. Dietrich, Z. Estrov, J. McCubrey, W. S. May, J. C. Reed, and M. Andreeff. 2006. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **10**:375-388.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh, and P. H. Schlesinger. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death. Differ.* **7**:1166-1173.
- Kozopas, K. M., T. Yang, H. L. Buchan, P. Zhou, and R. W. Craig. 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:3516-3520.
- Krajewska, M., S. Kitada, J. N. Winter, D. Variakojis, A. Lichtenstein, D. Zhai, M. Cuddy, X. Huang, F. Luciano, C. H. Baker, H. Kim, E. Shin, S. Kennedy, A. H. Olson, A. Badzio, J. Jassem, I. Meinhold-Heerlein, M. J. Duffy, A. D. Schimmer, M. Tsao, E. Brown, A. Sawyers, M. Andreeff, D. Mercola, S. Krajewski, and J. C. Reed. 2008. Bcl-B expression in human epithelial and nonepithelial malignancies. *Clin. Cancer Res.* **14**:3011-3021.
- Krajewski, S., S. Tanaka, S. Takayama, M. J. Schibler, W. Fenton, and J. C. Reed. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* **53**:4701-4714.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death. Differ.* **16**:3-11.

- Ku, B., C. Liang, J. U. Jung, and B. H. Oh. 2011.** Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res.* **21**:627-641.
- Kucharczak, J. F., M. J. Simmons, C. S. Duckett, and C. Gelinas. 2005.** Constitutive proteasome-mediated turnover of Bfl-1/A1 and its processing in response to TNF receptor activation in FL5.12 pro-B cells convert it into a prodeath factor. *Cell Death. Differ.* **12**:1225-1239.
- Kussie, P. H., S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine, and N. P. Pavletich. 1996.** Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**:948-953.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D. R. Green, and D. D. Newmeyer. 2002.** Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**:331-342.
- Lacroix, M., R. A. Toillon, and G. Leclercq. 2006.** p53 and breast cancer, an update. *Endocr. Relat Cancer* **13**:293-325.
- Lalier, L., P. F. Cartron, P. Juin, S. Nedelkina, S. Manon, B. Bechinger, and F. M. Vallette. 2007.** Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis.* **12**:887-896.
- Lanave, C., M. Santamaria, and C. Saccone. 2004.** Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* **333**:71-79.
- Lane, D. P., and L. V. Crawford. 1979.** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**:261-263.
- Laptenko, O., and C. Prives. 2006.** Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death. Differ.* **13**:951-961.
- Lee, D. H., J. H. Ha, Y. Kim, M. Jang, S. J. Park, H. S. Yoon, E. H. Kim, K. H. Bae, B. C. Park, S. G. Park, G. S. Yi, and S. W. Chi. 2014.** A Conserved Mechanism for Binding of p53 DNA-Binding Domain and Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Mol. Cells.*

Bibliographie

- Lee, H. W., S. S. Lee, S. J. Lee, and H. D. Um. 2003.** Bcl-w is expressed in a majority of infiltrative gastric adenocarcinomas and suppresses the cancer cell death by blocking stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Cancer Res.* **63**:1093-1100.
- Lee, R., J. Chen, C. P. Matthews, J. K. McDougall, and P. E. Neiman. 2001.** Characterization of NR13-related human cell death regulator, Boo/Diva, in normal and cancer tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **1520**:187-194.
- Lee, W. S., E. Y. Woo, J. Kwon, M. J. Park, J. S. Lee, Y. H. Han, and I. H. Bae. 2013.** Bcl-w Enhances Mesenchymal Changes and Invasiveness of Glioblastoma Cells by Inducing Nuclear Accumulation of beta-Catenin. *PLoS. One.* **8**:e68030.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, and S. J. Korsmeyer. 2002.** Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**:183-192.
- Leu, J. I., P. Dumont, M. Hafey, M. E. Murphy, and D. L. George. 2004.** Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* **6**:443-450.
- Levine, A. J. 1997.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**:323-331.
- Levine, A. J., and M. Oren. 2009.** The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* **9**:749-758.
- Li, C. H., Y. W. Cheng, P. L. Liao, and J. J. Kang. 2010.** Translocation of p53 to mitochondria is regulated by its lipid binding property to anionic phospholipids and it participates in cell death control. *Neoplasia.* **12**:150-160.
- Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang. 2001.** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**:95-99.
- Li, M., J. Luo, C. L. Brooks, and W. Gu. 2002.** Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.* **277**:50607-50611.

- Li, X., P. Dumont, P. A. Della, C. Shetler, and M. E. Murphy. 2005.** The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J. Biol. Chem.* **280**:24245-24251.
- Lindsten, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor, and C. B. Thompson. 2000.** The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol. Cell* **6**:1389-1399.
- Linzer, D. I., and A. J. Levine. 1979.** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**:43-52.
- Liu, J., D. K. St Clair, X. Gu, and Y. Zhao. 2008.** Blocking mitochondrial permeability transition prevents p53 mitochondrial translocation during skin tumor promotion. *FEBS Lett.* **582**:1319-1324.
- Liu, M., K. R. Dhanwada, D. F. Birt, S. Hecht, and J. C. Pelling. 1994.** Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* **15**:1089-1092.
- Liu, Q., and H. G. Wang. 2012.** Anti-cancer drug discovery and development: Bcl-2 family small molecule inhibitors. *Commun. Integr. Biol.* **5**:557-565.
- Liu, X., S. Dai, Y. Zhu, P. Marrack, and J. W. Kappler. 2003.** The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity*. **19**:341-352.
- Lu, J. H., Z. F. Shi, and H. Xu. 2014a.** The mitochondrial cyclophilin D/p53 complexation mediates doxorubicin-induced non-apoptotic death of A549 lung cancer cells. *Mol. Cell Biochem.* **389**:17-24.
- Lu, M., P. Miller, and X. Lu. 2014b.** Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. *FEBS Lett.*

Bibliographie

- Luciano, F., M. Krajewska, P. Ortiz-Rubio, S. Krajewski, D. Zhai, B. Faustin, J. M. Bruey, B. Bailly-Maitre, A. Lichtenstein, S. K. Kolluri, A. C. Satterthwait, X. K. Zhang, and J. C. Reed. 2007.** Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma. *Blood* **109**:3849-3855.
- MacLaine, N. J., and T. R. Hupp. 2009.** The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging (Albany, NY)* **1**:490-502.
- Madan, E., R. Gogna, M. Bhatt, U. Pati, P. Kuppusamy, and A. A. Mahdi. 2011.** Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget*. **2**:948-957.
- Mahyar-Roemer, M., C. Fritzsche, S. Wagner, M. Laue, and K. Roemer. 2004.** Mitochondrial p53 levels parallel total p53 levels independent of stress response in human colorectal carcinoma and glioblastoma cells. *Oncogene* **23**:6226-6236.
- Marchenko, N. D., and U. M. Moll. 2007.** The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53. *Cell Cycle* **6**:1718-1723.
- Marchenko, N. D., A. Zaika, and U. M. Moll. 2000.** Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **275**:16202-16212.
- Marzo, I., C. Brenner, N. Zamzami, J. M. Jurgensmeier, S. A. Susin, H. L. Vieira, M. C. Prevost, Z. Xie, S. Matsuyama, J. C. Reed, and G. Kroemer. 1998.** Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**:2027-2031.
- Matissek, K. J., M. Mossalam, A. Okal, and C. S. Lim. 2013.** The DNA binding domain of p53 is sufficient to trigger a potent apoptotic response at the mitochondria. *Mol. Pharm.* **10**:3592-3602.
- McConkey, D. J., J. Chandra, S. Wright, W. Plunkett, T. J. McDonnell, J. C. Reed, and M. Keating. 1996.** Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *J. Immunol.* **156**:2624-2630.

- Meijerink, J. P., E. J. Mensink, K. Wang, T. W. Sedlak, A. W. Sloetjes, W. T. de, G. Waksman, and S. J. Korsmeyer. 1998.** Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* **91**:2991-2997.
- Merino, D., S. L. Khaw, S. P. Glaser, D. J. Anderson, L. D. Belmont, C. Wong, P. Yue, M. Robati, B. Phipson, W. D. Fairlie, E. F. Lee, K. J. Campbell, C. J. Vandenberg, S. Cory, A. W. Roberts, M. J. Ludlam, D. C. Huang, and P. Bouillet. 2012.** Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood* **119**:5807-5816.
- Michalak, E. M., A. Villunger, J. M. Adams, and A. Strasser. 2008.** In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death. Differ.* **15**:1019-1029.
- Michels, J., P. W. Johnson, and G. Packham. 2005.** Mcl-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**:267-271.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll. 2003.** p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* **11**:577-590.
- Minn, A. J., C. M. Rudin, L. H. Boise, and C. B. Thompson. 1995.** Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* **86**:1903-1910.
- Miyashita, T., and J. C. Reed. 1995.** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**:293-299.
- Moldoveanu, T., Q. Liu, A. Tocilj, M. Watson, G. Shore, and K. Gehring. 2006.** The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Mol. Cell* **24**:677-688.
- Moll, U. M., and A. Zaika. 2001.** Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett.* **493**:65-69.
- Motoyama, N., T. Kimura, T. Takahashi, T. Watanabe, and T. Nakano. 1999.** bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* **189**:1691-1698.

Bibliographie

- Moulding, D. A., C. Akgul, M. Derouet, M. R. White, and S. W. Edwards. 2001.** BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* **70**:783-792.
- Nakayama, K., K. Nakayama, I. Negishi, K. Kuida, Y. Shinkai, M. C. Louie, L. E. Fields, P. J. Lucas, V. Stewart, F. W. Alt, and . 1993.** Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* **261**:1584-1588.
- Nemajerova, A., S. Erster, and U. M. Moll. 2005.** The post-translational phosphorylation and acetylation modification profile is not the determining factor in targeting endogenous stress-induced p53 to mitochondria. *Cell Death. Differ.* **12**:197-200.
- Nguyen, M., P. E. Branton, P. A. Walton, Z. N. Oltvai, S. J. Korsmeyer, and G. C. Shore. 1994.** Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J. Biol. Chem.* **269**:16521-16524.
- Nijhawan, D., M. Fang, E. Traer, Q. Zhong, W. Gao, F. Du, and X. Wang. 2003.** Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* **17**:1475-1486.
- Nikolaev, A. Y., M. Li, N. Puskas, J. Qin, and W. Gu. 2003.** Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* **112**:29-40.
- Oltersdorf, T., S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettesheim, S. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J. Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik, and S. H. Rosenberg. 2005.** An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**:677-681.
- Opferman, J. T., H. Iwasaki, C. C. Ong, H. Suh, S. Mizuno, K. Akashi, and S. J. Korsmeyer. 2005.** Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* **307**:1101-1104.

- Park, B. S., Y. S. Song, S. B. Yee, B. G. Lee, S. Y. Seo, Y. C. Park, J. M. Kim, H. M. Kim, and Y. H. Yoo. 2005. Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis*. **10**:193-200.
- Petit, E., L. Oliver, and F. M. Vallette. 2009. The mitochondrial outer membrane protein import machinery: a new player in apoptosis? *Front Biosci. (Landmark. Ed)* **14**:3563-3570.
- Petros, A. M., A. Gunasekera, N. Xu, E. T. Olejniczak, and S. W. Fesik. 2004. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett.* **559**:171-174.
- Pietsch, E. C., J. I. Leu, A. Frank, P. Dumont, D. L. George, and M. E. Murphy. 2007. The tetramerization domain of p53 is required for efficient BAK oligomerization. *Cancer Biol. Ther.* **6**:1576-1583.
- Pietsch, E. C., E. Perchiniak, A. A. Canutescu, G. Wang, R. L. Dunbrack, and M. E. Murphy. 2008. Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* **283**:21294-21304.
- Print, C. G., K. L. Loveland, L. Gibson, T. Meehan, A. Stylianou, N. Wreford, K. D. de, D. Metcalf, F. Kontgen, J. M. Adams, and S. Cory. 1998. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:12424-12431.
- Rathmell, J. C., T. Lindsten, W. X. Zong, R. M. Cinalli, and C. B. Thompson. 2002. Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat. Immunol.* **3**:932-939.
- Rautureau, G. J., C. L. Day, and M. G. Hinds. 2010a. Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **11**:1808-1824.
- Rautureau, G. J., C. L. Day, and M. G. Hinds. 2010b. The structure of Boo/Diva reveals a divergent Bcl-2 protein. *Proteins* **78**:2181-2186.
- Rautureau, G. J., M. Yabal, H. Yang, D. C. Huang, M. Kvensakul, and M. G. Hinds. 2012. The restricted binding repertoire of Bcl-B leaves Bim

Bibliographie

as the universal BH3-only prosurvival Bcl-2 protein antagonist. *Cell Death. Dis.* **3**:e443.

Reed, J. C. 2006. Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**:388-398.

Reed, J. C. 2008. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* **111**:3322-3330.

Reed, J. C., and M. Pellecchia. 2005a. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* **106**:408-418.

Reed, J. C., and M. Pellecchia. 2005b. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* **106**:408-418.

Rinkenberger, J. L., S. Horning, B. Klocke, K. Roth, and S. J. Korsmeyer. 2000. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* **14**:23-27.

Robbins, D., and Y. Zhao. 2012. Oxidative Stress Induced by MnSOD-p53 Interaction: Pro- or Anti-Tumorigenic? *J. Signal. Transduct.* **2012**:101465.

Roos, W. P., and B. Kaina. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* **12**:440-450.

Rooswinkel, R. W., B. van de Kooij, V. E. de, M. Paauwe, R. Braster, M. Verheij, and J. Borst. 2014. Anti-apoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood*.

Rosato, R. R., J. A. Almenara, S. S. Kolla, S. C. Maggio, S. Coe, M. S. Gimenez, P. Dent, and S. Grant. 2007. Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interactions. *Mol. Cancer Ther.* **6**:692-702.

Roset, R., L. Ortet, and G. Gil-Gomez. 2007. Role of Bcl-2 family members on apoptosis: what we have learned from knock-out mice. *Front Biosci.* **12**:4722-4730.

- Ruvolo, P. P., X. Deng, and W. S. May. 2001.** Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* **15**:515-522.
- Sakamuro, D., P. Sabbatini, E. White, and G. C. Prendergast. 1997.** The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15**:887-898.
- Sattler, M., H. Liang, D. Nettesheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson, and S. W. Fesik. 1997.** Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**:983-986.
- Schmidt, D., and S. Muller. 2002.** Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:2872-2877.
- Schmitt, C. A., C. T. Rosenthal, and S. W. Lowe. 2000.** Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat. Med.* **6**:1029-1035.
- Schmitt, E., C. Paquet, M. Beauchemin, and R. Bertrand. 2007.** DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J. Zhejiang. Univ Sci. B* **8**:377-397.
- Schreiber, V., F. Dantzer, J. C. Ame, and M. G. de. 2006.** Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:517-528.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, J. T. Opferman, E. H. Cheng, M. D. Sorcinelli, T. Pozzan, and S. J. Korsmeyer. 2003.** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**:135-139.
- Shao, Y., and A. E. Aplin. 2010.** Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Res.* **70**:6670-6681.
- Sheridan, C., G. Brumatti, and S. J. Martin. 2008.** Oncogenic B-RafV600E inhibits apoptosis and promotes ERK-dependent inactivation of Bad and Bim. *J. Biol. Chem.* **283**:22128-22135.

Bibliographie

- Shibuya, H., Y. Kato, M. Saito, T. Isobe, R. Tsuboi, M. Koga, H. Toyota, and J. Mizuguchi. 2003.** Induction of apoptosis and/or necrosis following exposure to antitumour agents in a melanoma cell line, probably through modulation of Bcl-2 family proteins. *Melanoma Res.* **13**:457-464.
- Shiloh, Y. 2001.** ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**:71-77.
- Shim, Y. H., E. K. Byun, M. J. Lee, J. Huh, and C. W. Kim. 2000.** Anti-apoptotic role of Bfl-1 in staurosporine-treated B-lymphoblastic cells. *Int. J. Hematol.* **72**:484-490.
- Shimizu, S., and Y. Tsujimoto. 2000.** Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:577-582.
- Shore, G. C., and J. Viallet. 2005.** Modulating the bcl-2 family of apoptosis suppressors for potential therapeutic benefit in cancer. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*:226-230.
- Shuker, S. B., P. J. Hajduk, R. P. Meadows, and S. W. Fesik. 1996.** Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**:1531-1534.
- Snowden, R. T., X. M. Sun, M. J. Dyer, and G. M. Cohen. 2003.** Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* **17**:1981-1989.
- Soengas, M. S., P. Capodiceci, D. Polsky, J. Mora, M. Esteller, X. Opitz-Araya, R. McCombie, J. G. Herman, W. L. Gerald, Y. A. Lazebnik, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe. 2001.** Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**:207-211.
- Sot, B., S. M. Freund, and A. R. Fersht. 2007.** Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J. Biol. Chem.* **282**:29193-29200.

- Souers, A. J., J. D. Levenson, E. R. Boghaert, S. L. Ackler, N. D. Catron, J. Chen, B. D. Dayton, H. Ding, S. H. Enschede, W. J. Fairbrother, D. C. Huang, S. G. Hymowitz, S. Jin, S. L. Khaw, P. J. Kovar, L. T. Lam, J. Lee, H. L. Maecker, K. C. Marsh, K. D. Mason, M. J. Mitten, P. M. Nimmer, A. Oleksijew, C. H. Park, C. M. Park, D. C. Phillips, A. W. Roberts, D. Sampath, J. F. Seymour, M. L. Smith, G. M. Sullivan, S. K. Tahir, C. Tse, M. D. Wendt, Y. Xiao, J. C. Xue, H. Zhang, R. A. Humerickhouse, S. H. Rosenberg, and S. W. Elmore. 2013. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**:202-208.
- Speidel, D. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* **20**:14-24.
- Spierings, D., G. McStay, M. Saleh, C. Bender, J. Chipuk, U. Maurer, and D. R. Green. 2005. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* **310**:66-67.
- Stommel, J. M., N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope, and G. M. Wahl. 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**:1660-1672.
- Strom, E., S. Sathe, P. G. Komarov, O. B. Chernova, I. Pavlovskaya, I. Shyshynova, D. A. Bosykh, L. G. Burdelya, R. M. Macklis, R. Skaliter, E. A. Komarova, and A. V. Gudkov. 2006. Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat. Chem. Biol.* **2**:474-479.
- Suzuki, M., R. J. Youle, and N. Tjandra. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**:645-654.
- Sykes, S. M., T. J. Stanek, A. Frank, M. E. Murphy, and S. B. McMahon. 2009. Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *J. Biol. Chem.* **284**:20197-20205.
- Tan, C. P., Y. Y. Lu, L. N. Ji, and Z. W. Mao. 2014. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. *Metallomics*. **6**:978-995.

Bibliographie

- Tang, H. J., D. Qian, V. K. Sondak, S. Stachura, and J. Lin. 2004.** A modified p53 enhances apoptosis in sarcoma cell lines mediated by doxorubicin. *Br. J. Cancer* **90**:1285-1292.
- Tchernev, G., and C. E. Orfanos. 2007.** Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. *J. Cutan. Pathol.* **34**:247-256.
- Thomas, L. W., C. Lam, and S. W. Edwards. 2010.** Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* **584**:2981-2989.
- Thomas, M., D. Pim, and L. Banks. 1999.** The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**:7690-7700.
- Tomita, Y., N. Marchenko, S. Erster, A. Nemajerova, A. Dehner, C. Klein, H. Pan, H. Kessler, P. Pancoska, and U. M. Moll. 2006.** WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J. Biol. Chem.* **281**:8600-8606.
- Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell, and C. M. Croce. 1984.** Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**:1097-1099.
- van de Kooij, B., R. W. Rooswinkel, F. Kok, M. Herrebout, V. E. de, M. Paauwe, G. M. Janssen, P. A. van Veelen, and J. Borst. 2013.** Polyubiquitination and proteasomal turnover controls the anti-apoptotic activity of Bcl-B. *Oncogene* **32**:5439-5448.
- van, L. G., X. Saelens, G. M. van, M. MacFarlane, S. J. Martin, and P. Vandenabeele. 2002.** The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death. Differ.* **9**:1031-1042.
- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer. 2010.** Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:700-714.

- Vaseva, A. V., and U. M. Moll. 2009.** The mitochondrial p53 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**:414-420.
- Vassilev, L. T., B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, and E. A. Liu. 2004.** In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**:844-848.
- Vaux, D. L., S. Cory, and J. M. Adams. 1988.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**:440-442.
- Venot, C., M. Maratrat, V. Sierra, E. Conseiller, and L. Debussche. 1999.** Definition of a p53 transactivation function-deficient mutant and characterization of two independent p53 transactivation subdomains. *Oncogene* **18**:2405-2410.
- Ventura, A., D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder, and T. Jacks. 2007.** Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**:661-665.
- Verhaegen, M., J. A. Bauer, d. I. Martin, V. G. Wang, K. G. Wolter, J. C. Brenner, Z. Nikolovska-Coleska, A. Bengtson, R. Nair, J. T. Elder, B. M. Van, T. E. Carey, C. R. Bradford, S. Wang, and M. S. Soengas. 2006.** A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res.* **66**:11348-11359.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and D. L. Vaux. 2000.** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**:43-53.
- Vogelstein, B., and K. W. Kinzler. 2004.** Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**:789-799.
- Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine. 2000.** Surfing the p53 network. *Nature* **408**:307-310.

Bibliographie

- Vogler, M. 2012.** BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death. Differ.* **19**:67-74.
- Vousden, K. H., and D. P. Lane. 2007.** p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:275-283.
- Wan, P. T., M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford, and R. Marais. 2004.** Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**:855-867.
- Wang, C. Y., D. C. Guttridge, M. W. Mayo, and A. S. Baldwin, Jr. 1999.** NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **19**:5923-5929.
- Wang, G., Z. Nikolovska-Coleska, C. Y. Yang, R. Wang, G. Tang, J. Guo, S. Shangary, S. Qiu, W. Gao, D. Yang, J. Meagher, J. Stuckey, K. Krajewski, S. Jiang, P. P. Roller, H. O. Abaan, Y. Tomita, and S. Wang. 2006.** Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J. Med. Chem.* **49**:6139-6142.
- Wang, J., and M. J. Lenardo. 2000.** Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 5)**:753-757.
- Wang, J. L., D. Liu, Z. J. Zhang, S. Shan, X. Han, S. M. Srinivasula, C. M. Croce, E. S. Alnemri, and Z. Huang. 2000.** Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:7124-7129.
- Wang, X., C. Yang, J. Chai, Y. Shi, and D. Xue. 2002.** Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **298**:1587-1592.
- Weber, A., Z. Kirejczyk, S. Potthoff, C. Ploner, and G. Hacker. 2009.** Endogenous Noxa Determines the Strong Proapoptotic Synergism of the BH3-Mimetic ABT-737 with Chemotherapeutic Agents in Human Melanoma Cells. *Transl. Oncol.* **2**:73-83.

- Wei, M. C., T. Lindsten, V. K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. 2000.** tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* **14**:2060-2071.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson, and S. J. Korsmeyer. 2001.** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**:727-730.
- Weisz, L., M. Oren, and V. Rotter. 2007.** Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* **26**:2202-2211.
- Weng, S. Y., C. Y. Yang, C. C. Li, T. P. Sun, S. Y. Tung, J. J. Yen, T. F. Tsai, C. M. Chen, S. H. Chen, M. Hsiao, P. H. Huang, and H. F. Yang-Yen. 2011.** Synergism between p53 and Mcl-1 in protecting from hepatic injury, fibrosis and cancer. *J. Hepatol.* **54**:685-694.
- Wilson, J. W., M. C. Nostro, M. Balzi, P. Faraoni, F. Cianchi, A. Becciolini, and C. S. Potten. 2000.** Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **82**:178-185.
- Wilson-Annan, J., L. A. O'Reilly, S. A. Crawford, G. Hausmann, J. G. Beaumont, L. P. Parma, L. Chen, M. Lackmann, T. Lithgow, M. G. Hinds, C. L. Day, J. M. Adams, and D. C. Huang. 2003.** Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J. Cell Biol.* **162**:877-887.
- Wyman, C., and R. Kanaar. 2006.** DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* **40**:363-383.
- Xiang, Z., A. A. Ahmed, C. Moller, K. Nakayama, S. Hatakeyama, and G. Nilsson. 2001.** Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation. *J. Exp. Med.* **194**:1561-1569.
- Xu, H., J. Tai, H. Ye, C. B. Kang, and H. S. Yoon. 2006.** The N-terminal domain of tumor suppressor p53 is involved in the molecular interaction with the anti-apoptotic protein Bcl-XL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**:938-944.

Bibliographie

- Xu, H., H. Ye, N. E. Osman, K. Sadler, E. Y. Won, S. W. Chi, and H. S. Yoon. 2009.** The MDM2-binding region in the transactivation domain of p53 also acts as a Bcl-X(L)-binding motif. *Biochemistry* **48**:12159-12168.
- Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S. W. Lowe. 2007.** Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**:656-660.
- Yakovlev, A. G., G. S. Di, G. Wang, W. Liu, B. Stoica, and A. I. Faden. 2004.** BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**:28367-28374.
- Yang, F., H. Chen, Y. Liu, K. Yin, Y. Wang, X. Li, G. Wang, S. Wang, X. Tan, C. Xu, Y. Lu, and B. Cai. 2013.** Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. *Cell Physiol Biochem.* **32**:1072-1082.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang. 1997.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**:1129-1132.
- Yang, T., K. M. Kozopas, and R. W. Craig. 1995.** The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol.* **128**:1173-1184.
- Yang, W. S., J. K. Ko, S. O. Park, H. Y. Choi, Y. N. Kim, and C. W. Kim. 2005.** C-terminal region of Bfl-1 induces cell death that accompanies caspase activation when fused with GFP. *J. Cell Biochem.* **94**:1234-1247.
- Yao, H., S. Mi, W. Gong, J. Lin, N. Xu, S. Perrett, B. Xia, J. Wang, and Y. Feng. 2013.** Anti-apoptosis proteins Mcl-1 and Bcl-xL have different p53-binding profiles. *Biochemistry* **52**:6324-6334.
- Yasui, K., S. Mihara, C. Zhao, H. Okamoto, F. Saito-Ohara, A. Tomida, T. Funato, A. Yokomizo, S. Naito, I. Imoto, T. Tsuruo, and J. Inazawa. 2004.** Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Res.* **64**:1403-1410.

- Yecies, D., N. E. Carlson, J. Deng, and A. Letai. 2010.** Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* **115**:3304-3313.
- Yip, K. W., and J. C. Reed. 2008.** Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27**:6398-6406.
- Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren. 1991.** Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**:345-347.
- Yoshida, Y., H. Izumi, T. Torigoe, H. Ishiguchi, H. Itoh, D. Kang, and K. Kohno. 2003.** P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res.* **63**:3729-3734.
- Youle, R. J., and A. Strasser. 2008.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:47-59.
- Zaffaroni, N., M. Pennati, and M. G. Daidone. 2005.** Survivin as a target for new anticancer interventions. *J. Cell Mol. Med.* **9**:360-372.
- Zamzami, N., S. A. Susin, P. Marchetti, T. Hirsch, I. Gomez-Monterrey, M. Castedo, and G. Kroemer. 1996.** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**:1533-1544.
- Zhai, D., C. Jin, Z. Huang, A. C. Satterthwait, and J. C. Reed. 2008.** Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J. Biol. Chem.* **283**:9580-9586.
- Zhai, D., N. Ke, H. Zhang, U. Lador, M. Joseph, A. Eichinger, A. Godzik, S. C. Ng, and J. C. Reed. 2003.** Characterization of the anti-apoptotic mechanism of Bcl-B. *Biochem. J.* **376**:229-236.
- Zhang, H., P. Nimmer, S. H. Rosenberg, S. C. Ng, and M. Joseph. 2002.** Development of a high-throughput fluorescence polarization assay for Bcl-x(L). *Anal. Biochem.* **307**:70-75.
- Zheng, J. 2012.** Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol. Lett.* **4**:1151-1157.

Bibliographie

- Zhou, P., N. B. Levy, H. Xie, L. Qian, C. Y. Lee, R. D. Gascoyne, and R. W. Craig. 2001.** MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* **97**:3902-3909.
- Zong, W. X., C. Li, G. Hatzivassiliou, T. Lindsten, Q. C. Yu, J. Yuan, and C. B. Thompson. 2003.** Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* **162**:59-69.