

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

---

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2014

N° 05

Résistance au témozolomide dans le  
glioblastome multiforme :  
Rôle de l'induction du HBEGF

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Cancérologie

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Quentin SÉRY**

*Le 07/02/2014 devant le jury ci-dessous*

Président	Pr. François-Régis BATAILLE	PU/PH, Angers
Rapporteurs	Dr. Amandine HURBIN	CR2, Grenoble
	Pr. Antoine GALMICHE	PU/PH, Amiens
Examineurs	Dr. Solange DESAGHER	CR1, Montpellier
Directeur de thèse	Dr. François M. VALLETTE	DR1, Nantes
Co-encadrant de thèse	Dr. Catherine GRATAS-RABBIA-RÉ	MCU/PH, Nantes

## Remerciements

Je remercie chaleureusement le Dr. François Vallette de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir cultivé mon esprit scientifique qui, un jour je l'espère, sera aussi riche que le sien. Je remercie tout particulièrement le Dr. Catherine Gratas qui m'a encadré depuis le début de ce projet et qui m'a soutenu jusqu'à la fin. Merci encore d'avoir pris le temps pour la relecture (fastidieuse) de ce manuscrit.

Je remercie le Pr. Antoine Galmiche et le Dr. Amandine Hurbin qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Vos comptes-rendus élogieux m'ont fait énormément plaisir. Merci au Pr. François-Régis Bataille et au Dr. Solange Desagher d'avoir participé à mon jury de thèse, je vous en suis très reconnaissant.

Mes remerciements personnels commencent bien entendu par tous les membres de l'équipe 9 que j'ai pu côtoyer pendant ces 4 années. Merci à Lisa, à qui je dois toujours un gâteau, à Lisenn, Pef et Claire pour leurs conseils avisés. Merci à Shankar pour nos discussions en créole, les échanges de bouffe indienne et réunionnaise et pour être toujours le premier à tout savoir sur les nouvelles stagiaires. Je n'oublie pas les anciens, merci à Marie et Elise de m'avoir accueilli chaleureusement dans la pièce 410, je sais que tout va bien aujourd'hui pour vous, je ne peux que souhaiter que cela continue. Merci à Jean pour ses anecdotes de laboratoire et nos discussions de fin de soirée, profite bien de ta nouvelle vie de retraité.

Le laboratoire fut un lieu de travail mais aussi un lieu où j'ai pu rencontrer de nombreux amis. Merci à Nourdine, mon « frère » de labo avec qui j'ai débuté et avec qui j'ai fini (on y est arrivé mec !). Même si tu me diras que non, ta soutenance était une des meilleures que j'ai pu voir et je sais que tu continueras loin dans la recherche. Merci à Vincent d'avoir partagé mon bureau et mes pauses café pendant ces dernières années, courage c'est la dernière ligne droite. Merci à Mazène, tu n'es pas là depuis longtemps mais c'est suffisant pour que je t'apprécie vraiment. Merci à Carole, Potiron, Rym et Denis d'avoir été là au 4<sup>ème</sup> étage notre groupe d'amis me tient beaucoup à cœur et j'espère qu'il perdurera (au moins jusqu'à la réalisation de « enquete nationale 2 »). Merci aussi aux autres membres de notre groupe, Charline, Myriam et Sarah et Judith. Une mention spéciale à Pacôme et Carole qui vont être futurs parents et avec qui j'ai passé des moments inoubliables au Hellfest. Je remercie aussi Meumeu, toujours de bonne humeur, qui vogue vers de nouveaux cieux avec Stéven (merci de m'avoir fait découvrir le taekwon-do).

Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai passé de bons moments au laboratoire et à l'extérieur. Mention spéciale à l'équipe 8 (ma participation au pot de création d'équipe fait-elle de moi un membre honoraire ?), merci à Philippe et Sophie, Fabien, Céline et Joséphine. Bon courage à Eloïse et Jessie pour la fin de leur thèse. Je remercie mes amis de l'association ADN Bio-santé, JB et JB, Jérémie, Iza, Mathilde et Etienne. Je ne leur souhaite que du bonheur pour leurs thèses passés et futures. Merci à Maxime qui a été là au début et avec qui j'ai eu de bons moments.

Merci à mes amis de toujours Bastien, Luc, Cao, Coline et Adèle, nous ne nous voyons pas assez souvent mais à chaque fois c'est comme si c'était hier. Merci à Maxime, Jojo, Anaïs, Audrey, Ludo et Séverine, nos années à la fac me manquent.

Je remercie ma mère, qui m'a soutenu à distance et qui même après 27 années se fait toujours autant de soucis pour moi. Merci à ma sœur et mon frère et merci à mes « petits » neveux qui sont ma joie de vivre. Merci aussi à ma deuxième famille qui m'a accueilli à bras ouverts et que j'apprécie énormément.

Enfin, je remercie celle qui tient la plus grande place dans mon cœur, celle qui a su me rendre heureux depuis maintenant 2 années, celle avec qui j'ai envie de continuer encore longtemps, même à l'autre bout du monde. Merci à toi mon amour. « You're my girlfriend ! »

## SOMMAIRE

Introduction.....	- 1 -
A. Le Glioblastome Multiforme .....	- 2 -
1 Origines des GBMs.....	- 2 -
2 Classification selon l'étude du <i>Cancer Genome Atlas Project</i> .....	- 6 -
3 Traitement du Glioblastome.....	- 8 -
B. Le Témzolomide : des lésions de l'ADN aux mécanismes de résistance .....	- 10 -
1 Le TMZ : un agent méthylant .....	- 10 -
2 Résistance aux lésions O <sup>6</sup> -MeG causées par le TMZ dans les gliomes. ....	- 12 -
3 Signalisation et réparation des dommages double brin de l'ADN induits par le TMZ .....	- 15 -
C. L'apoptose et la famille Bcl-2 .....	- 22 -
1 Voie extrinsèque .....	- 22 -
2 Voie intrinsèque .....	- 24 -
3 Régulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2.....	- 29 -
4 Famille Bcl-2 et gliomes .....	- 32 -
5 Interconnexion entre l'autophagie et l'apoptose dans la réponse au TMZ.....	- 32 -
D. L'EGFR et ses ligands dans la résistance au traitement.....	- 36 -
1 La famille de récepteur à tyrosine kinase HER.....	- 36 -
2 EGFR dans le GBM .....	- 46 -
3 Intérêt du ciblage du HBEGF dans la thérapie des GBMs .....	- 51 -
E. Objectifs de la thèse.....	- 56 -
Matériels & Méthodes.....	- 57 -
1 Culture cellulaire.....	- 58 -
2 Infections lentivirales .....	- 58 -
3 Analyse des protéines totales par Western Blot.....	- 58 -
4 Extraction d'ARN et analyse par PCR quantitative.....	- 59 -
5 Extraction d'ADN et bisulfitation.....	- 59 -

---

6	Test de cytotoxicité par MTT.....	- 60 -
7	Dosage du HBEGF par ELISA .....	- 60 -
8	Immunocytochimie .....	- 61 -
9	Marquage <i>in vivo</i> MDH .....	- 61 -
10	Test de proximité par ligation <i>in situ</i> (P-LISA) .....	- 61 -
11	Essai caspase .....	- 62 -
12	Test de réparation de blessure .....	- 63 -
13	Analyses statistiques .....	- 63 -
14	Produits .....	- 63 -
15	Anticorps.....	- 63 -
	Résultats.....	- 65 -
A.	Le TMZ et l'induction de la mort cellulaire .....	- 66 -
1	Implication de l'axe Mcl-1/Bak dans l'apoptose induite par le TMZ....	- 66 -
2	L'autophagie est-elle impliquée ?.....	- 86 -
B.	La résistance au TMZ .....	- 90 -
1	Réponse au TMZ et phénotype .....	- 90 -
2	MGMT acteur principal de la résistance au TMZ.....	- 91 -
3	EGFR et ses ligands dans la résistance au TMZ.....	- 96 -
C.	Rôle de l'induction du HBEGF par le TMZ.....	- 102 -
1	Quantification du HBEGF .....	- 102 -
2	HBEGF et cytotoxicité.....	- 105 -
3	HBEGF et EGFR .....	- 107 -
4	Le HBEGF et dommages de l'ADN .....	- 108 -
5	Le HBEGF et la résistance au TMZ dans la lignée U251.....	- 116 -
6	Le HBEGF et protéines de la famille Bcl2 .....	- 119 -
	Discussion.....	- 124 -
1	Mécanismes de mort du TMZ.....	- 125 -
2	Résistance au TMZ .....	- 127 -
3	Quel est le rôle du HBEGF dans la réponse au TMZ ?.....	- 129 -

4	Conclusion générale .....	- 135 -
	BIBLIOGRAPHIE .....	- 136 -
	ANNEXE .....	- 157 -

## Liste des abréviations

ADAM : a desintegrin and metalloproteinase  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AGT : alkylguanine-DNA alkyl-transferase  
APAF-1 : apoptotic protease activating factor 1  
ARN : acide ribonucléique  
ATM : ataxia telangiectesia mutated  
ATR : ATM and RAD3 related  
ATRIP : ATR interacting protein  
BAG-1 : Bcl-2 associated gene  
Bax : Bcl-2 associated protein  
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2  
BER : base excision repair  
BH : Bcl-2 homology domain  
CHK : checkpoint kinase  
DDR : DNA damage repair  
DIABLO : direct IAP binding protein with low PI  
DNA-PK : DNA dependent protein kinase  
DNMT : DNA methyltransferase  
DSB : double-strand break  
EGF : epidermal growth factor  
EGFR : epidermal growth factor receptor  
EMT : epithelial-mesenchymal transition  
ERK : extracellular signal regulated kinase  
FADD : FAS-associated protein with death domain  
FDA : food and drugs agency  
GBM : glioblastome  
GSK : glycogen synthase kinase  
H2AX : histone 2A family member X  
HBEGF : heparin binding epidermal growth factor  
HIF : hypoxia inducible factor  
HR : homologous recombination  
IAP : inhibitor of apoptosis protein

IDH : isocitrate deshydrogenase  
IR : irradiation  
Mcl-1 : myeloid cell leukemia 1  
MMP : matrix metalloproteinase  
MMR : mismatch repair  
MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
NHEJ : non homologous end joining  
OMS : organisation mondiale de la santé  
PDGF : platelet derived growth factor  
PI3K : phosphoinositide-3 kinase  
PIKK : phosphoinositide-3 kinase-like kinase  
PLZF : promyelocytic leukemia zinc finger  
PTEN : phosphatase and tensin homolog  
QPCR : quantitative polymerase chain reaction  
RH : recombinaison homologue  
RTK : récepteur à tyrosine kinase  
SHH : sonic hedgehog  
SMAC : second mitochondrial activator of caspase  
SSB : single-strand break  
TGF : transforming growth factor  
TKI : tyrosine kinase inhibitor  
TMZ : témozolomide  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
XIAP : X-linked IAP

## Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) est une tumeur cérébrale hautement réfractaire au traitement. Ces dernières années l'utilisation du témozolomide (TMZ), un agent alkylant, couplé à la radiothérapie a permis d'augmenter la survie des patients mais celle-ci reste en moyenne inférieure à un an. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au rôle des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak dans l'apoptose induite par le TMZ. Nous avons pu mettre en évidence un rôle préminent de l'axe Mcl-1/Bak dans l'induction de l'apoptose en réponse au TMZ.

Le récepteur à tyrosine kinase EGFR est impliqué dans l'oncogenèse des GBMs primaires (35-45% d'amplification) mais aussi dans la résistance au traitement. Dans un second temps nous avons donc analysé l'expression de ligands d'EGFR et mis en évidence une surexpression du HBEGF en réponse au TMZ dans deux lignées n'exprimant pas l'enzyme de réparation MGMT principal facteur de résistance au TMZ. Contre-intuitivement le HBEGF n'a pas de rôle dans la résistance mais s'est révélé être impliqué dans la dégradation de Mcl-1 induite par le TMZ. Ce rôle est indépendant de l'activité de l'EGFR. Nos résultats suggèrent l'implication de la protéine cochaperonne BAG-1 et de la déubiquitinase USP9X dans ce mécanisme.

Globalement, nos résultats identifient Bak comme l'inducteur principal de l'apoptose après un traitement par le TMZ, proposent un nouveau mécanisme de dégradation de Mcl-1 et mettent en avant un rôle du HBEGF dans la réponse au traitement indépendamment de son récepteur EGFR. De plus, ils identifient BAG-1 comme partenaire privilégié du HBEGF et l'implique dans la régulation de Mcl-1 par sa déubiquitinase USP9X.

**Mots-clés** : glioblastome, témozolomide, apoptose, Mcl-1, HBEGF

---

## **Abstract**

Glioblastoma multiforme (GBM) is a cerebral tumor highly refractory to treatment. Over the past years the alkylating agent temozolomide (TMZ) associated with radiotherapy has improved the survival of patients but overall survival is still inferior to one year. During this thesis, we first examine the role of pro-apoptotic proteins Bax and Bak in TMZ-induced apoptosis and highlighted the major role of Mcl-1/Bak axis in TMZ mediated apoptosis.

The tyrosine kinase receptor EGFR is implicated in primary GBMs oncogenesis (35-45% of amplification) and in resistance to treatment. Then we analyzed expression of EGFR ligands and founded an up-regulation of HBEGF in response to TMZ in two cell lines without expression of the repair enzyme MGMT the main resistance factor to TMZ. Counter-intuitively HBEGF is not involved in resistance but in TMZ-induced Mcl-1 degradation. This role is independent of EGFR activity. Implication of HBEGF in Mcl-1 degradation has no effect on caspases activity after TMZ treatment. Among the few known intracellular partners of HBEGF the chaperone protein BAG-1 is implicated in Mcl-1 expression maintenance. Indeed BAG-1 regulates Mcl-1 through its deubiquitinase USP9X. TMZ enable HBEGF/BAG-1 interactions and disable USP9X/Mcl-1 interactions.

Our results then identify Bak as the main apoptosis inducer in response to TMZ, propose a new mechanism for the induced degradation of Mcl-1 and highlight a new role of HBEGF independently of its receptor EGFR. Moreover they identify BAG-1 as a favored partner of HBEGF et implicate it in Mcl-1 regulation via its deubiquitinase USP9X.

**Keywords** : glioblastoma, temozolomide, apoptosis, Mcl-1, HBEGF

## Liste des Figures

FIGURE 1 VOIES DES ALTERATIONS GENETIQUES DIFFERENCIANT GBMS PRIMAIRES ET SECONDAIRES.....	- 4 -
FIGURE 2 VOIES DE SIGNALISATIONS MAJEURES IMPLIQUEES DANS LA PATHOGENESE DES GLIOBLASTOMES -	5 -
FIGURE 3 MECANISMES DE CYTOTOXICITE DU TMZ ET VOIES DE REPARATION DE L'ADN ACTIVEES. ....	- 11 -
FIGURE 4 PRISE EN CHARGE DES LESIONS O <sup>6</sup> -METHYLGUANINE.....	- 12 -
FIGURE 5 REPARATION PAR MGMT. ....	- 13 -
FIGURE 6 REPARATION MMR.....	- 15 -
FIGURE 7 MODELE SIMPLIFIE DE L'ACTIVATION D'ATM ET D'ATR .....	- 17 -
FIGURE 8 VOIES DE TRANSDUCTION DE LA SIGNALISATION DES DSBS .....	- 20 -
FIGURE 9 LES VOIES INTRINSEQUE ET EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE .....	- 23 -
FIGURE 10 CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 .....	- 25 -
FIGURE 11 INTERACTIONS DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2.....	- 26 -
FIGURE 12 MODELES DE REGULATION DE L'ACTIVATION DE BAX PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2..	- 27 -
FIGURE 13 ACTEURS DE LA REGULATION DE MCL-1. ....	- 31 -
FIGURE 14 PROCESSUS D'AUTOPHAGIE .....	- 33 -
FIGURE 15 MODELE DE REPOSE AU TMZ.....	- 34 -
FIGURE 16 STRUCTURE RECEPTEUR HER.....	- 37 -
FIGURE 17 MECANISME DE FIXATION DU LIGAND ET DE DIMERISATION D'EGFR.....	- 39 -
FIGURE 18 VOIES DE SIGNALISATION DE L'EGFR.....	- 43 -
FIGURE 19 TRANSACTIVATION D'EGFR .....	- 44 -
FIGURE 20 ALTERATIONS GENETIQUES DE LA VOIE RTK/RAS/PI3K DANS LES GLIOBLASTOMES.....	- 47 -
FIGURE 21 INHIBITEURS CIBLANT L'EGFR UTILISES EN CLINIQUE. ....	- 49 -
FIGURE 22 ACTIVITES DU HBEGF.....	- 54 -
<b>FIGURE 23</b> TMZ INDUCED APOPTOSIS AND G2 CELL ARREST AT THERAPEUTIC CONCENTRATIONS IN U251 CELLS.....	- 81 -
FIGURE 24 INFLUENCE OF TMZ ON THE EXPRESSION OF KEY MEMBERS OF THE BCL-2 FAMILY. ....	- 82 -
FIGURE 25 TMZ INDUCED APOPTOSIS IN U251 CELLS VIA THE PRO-APOPTOTIC PROTEIN BAK.....	- 83 -
FIGURE 26 TMZ INDUCED APOPTOSIS IN U251-MGMT POSITIVE CELLS VIA BAL PROTEIN.....	- 84 -
FIGURE 27 TMZ INDUCED APOPTOSIS IN LN18 IS ALSO MCL-1 AND BAK DEPENDENT. ....	- 85 -
FIGURE 28 INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE PAR LE TMZ DANS LES LIGNEES U251 ET U87 .....	- 87 -
FIGURE 29 EFFETS DE L'EXTINCTION DE BAK SUR LE CLIVAGE DE LC3B ET P62.....	- 88 -
FIGURE 30 QUANTIFICATION DES VESICULES LIPIDIQUES. ....	- 88 -
FIGURE 31 EXPRESSION DE L'ENZYME MGMT DANS LES LIGNEES U251 LN18 ET U87.....	- 90 -
FIGURE 32 REPOSE AUX AGENTS ALKYLANTS.....	- 91 -
FIGURE 33 INDUCTION DE LA MGMT DANS LA LIGNEE U251.....	- 92 -
FIGURE 34 COLONIES FORMEES PAR LES CELLULES U251 SOUMISES A UN TRAITEMENT PROLONGE AU TMZ. -	93

FIGURE 35 RESISTANCE AUX AGENTS ALKYLANTS DE LA LIGNEE U251R.....	- 93 -
FIGURE 36 EXPRESSION DE MGMT PAR LES CELLULES U251R.....	- 94 -
FIGURE 37 METHYLATION DE <i>MGMT</i> . ....	- 94 -
FIGURE 38 FOCI $\gamma$ H2AX EN REPONSE AU TMZ. ....	- 95 -
FIGURE 39 EXPRESSION D'EGFR.....	- 97 -
FIGURE 40 EXPRESSION DE L'ARNM D'EGFR EN REPONSE AU TMZ.....	- 97 -
FIGURE 41 EXPRESSION D'EGFR DANS LES U251R. ....	- 98 -
FIGURE 42 INHIBITION D'EGFR EN COMBINAISON AVEC LE TMZ. ....	- 99 -
FIGURE 43 INHIBITION D'EGFR EN FONCTION DU STATUT BAX ET BAK DANS LA LIGNEE U251 .....	- 99 -
FIGURE 44 NIVEAU D'ARNM DES LIGANDS D'EGFR. ....	- 100 -
FIGURE 45 EXPRESSION DES LIGANDS D'EGFR EN REPONSE AU TMZ. ....	- 101 -
FIGURE 46 QUANTIFICATION DU HBEGF.....	- 103 -
FIGURE 47 IMMUNOMARQUAGE DU HBEGF.....	- 104 -
FIGURE 48 COTRAITEMENT AU HBEGF SOLUBLE ET SURNAGEANT DE U251R.....	- 105 -
FIGURE 49 INHIBITION DU HBEGF PAR LE CRM197.. ....	- 106 -
FIGURE 50 INVALIDATION DU HBEGF. ....	- 107 -
FIGURE 51 PHOSPHORYLATION D'EGFR.....	- 108 -
FIGURE 52 EXPRESSION DU HBEGF. ....	- 109 -
FIGURE 53 EXPRESSION DU HBEGF EN REPONSE A L'IRRADIATION. ....	- 109 -
FIGURE 54 PARALLELE ENTRE EXPRESSION DU HBEGF ET FOCI $\gamma$ H2AX. ....	- 110 -
FIGURE 55 SATURATION DE LA MGMT DANS LA LIGNEE U251R. ....	- 111 -
FIGURE 56 EXTINCTION DU HBEGF ET FOCI H2AX. ....	- 112 -
FIGURE 57 INHIBITION DU HBEGF PAR LE CRM197 ET FOCI $\gamma$ H2AX.....	- 113 -
FIGURE 58 LOCALISATION DU PROHBEGF.....	- 114 -
FIGURE 59 ACTIVATION D'ATR.....	- 115 -
FIGURE 60 INHIBITION DE DNA-PKC .....	- 115 -
FIGURE 61 EXPRESSION DE LA MGMT.. ....	- 117 -
FIGURE 62 RESISTANCE AU TMZ.. ....	- 118 -
FIGURE 63 ROLE DU HBEGF DANS LA MORT INDUITE PAR LE TMZ. ....	- 118 -
FIGURE 64 EXPRESSION DES PROTEINES PRO- ET ANTIAPOPTOTIQUES.....	- 119 -
FIGURE 65 DEGRADATION DE MCL-1 EN FONCTION DU STATUT HBEGF. ....	- 120 -
FIGURE 66 INTERACTIONS MCL-1/USP9X.. ....	- 121 -
FIGURE 67 CINETIQUE D'EXPRESSION DE MCL-1 ET USP9X. ....	- 122 -
FIGURE 68 INTERACTIONS HBEGF/BAG1.. ....	- 122 -

## Introduction générale

La thématique de notre laboratoire est centrée sur l'étude des mécanismes apoptotiques dans le glioblastome multiforme. Ce cancer du système nerveux central représente un défi thérapeutique de par sa localisation intracrânienne, son hétérogénéité caractéristique et sa résistance à la radio/chimiothérapie. C'est pourquoi notre équipe s'articule autour de quatre axes de recherche 1) les mécanismes de méthylation de l'ADN, 2) la caractérisation des cellules souches, 3) la dérégulation du métabolisme et 4) l'influence des facteurs solubles. Ainsi ce travail de thèse s'inscrit dans le quatrième axe et s'est intéressé au rôle des ligands d'EGFR dans la résistance au témozolomide (TMZ), principal agent de chimiothérapie utilisé dans le glioblastome.

Dans une première partie de notre travail, nous avons étudié les mécanismes apoptotiques impliqués dans la mort induite par le TMZ. En effet le TMZ est capable d'induire l'apoptose, l'autophagie et la sénescence des cellules de gliome. Les acteurs de la famille des protéines anti- et pro-apoptotiques Bcl-2 impliqués dans l'apoptose induite par le TMZ ne sont pas connus. Nos résultats montrent que les deux principaux acteurs pro-apoptotiques Bax et Bak ont des rôles non redondants dans l'induction de l'apoptose par le TMZ. En effet le TMZ induit une dégradation de Mcl-1 et l'apoptose qu'il induit est fortement dépendante de Bak et non de Bax. En parallèle nous avons étudié l'induction de l'autophagie par le TMZ, puisque ce phénomène est couramment décrit dans la littérature.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la résistance au TMZ et notamment à l'implication de l'enzyme MGMT et de l'EGFR. Le seul facteur prédictif de réponse au TMZ dans le GBM est le statut de méthylation du promoteur du gène *MGMT*. Ce gène code pour l'enzyme de réparation MGMT qui est capable de retirer les adduits méthyls du TMZ sur l'ADN et ainsi de prévenir les cassures double brin. Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) quant à lui est une cible majeure dans l'oncogenèse des glioblastomes ainsi que dans la résistance au traitement. Pourtant les essais cliniques testant des thérapies ciblées contre l'EGFR dans le glioblastome ont eu des résultats décevants alors que ces mêmes thérapies étaient prometteuses dans le cancer du poumon. La modulation fine d'EGFR par l'inhibition de ligands spécifiques de la réponse au traitement est un axe thérapeutique peu exploité. Les ligands d'EGFR sont par ailleurs sécrétés dans le milieu extracellulaire et sont donc des marqueurs potentiels de la réponse au traitement chez les patients. Nous avons pu mettre en évidence que les dommages de l'ADN provoqués par le

TMZ engendraient la surexpression d'un ligand d'EGFR particulier : le HBEGF. Une surexpression rapide du HBEGF en réponse au traitement a déjà été décrite et participe à la résistance des cellules via une activation d'EGFR. Notre travail suggère au contraire un rôle indépendant du HBEGF vis-à-vis de son récepteur. En effet, le HBEGF s'est révélé impliqué dans la régulation de la dégradation de Mcl-1 suite au déclenchement de l'apoptose par le TMZ.

L'ensemble de ces résultats mettent en lumière l'importance de l'axe Mcl-1/Bak dans l'apoptose induite par le TMZ dans les lignées de glioblastome. Par ailleurs nos résultats indiquent un rôle nouveau pour le HBEGF de manière indépendante de son récepteur.

L'introduction rappellera les origines et l'hétérogénéité des glioblastomes ainsi que les traitements actuellement utilisés. Le TMZ, aujourd'hui considéré comme le traitement de référence, sera particulièrement détaillé, notamment son mode d'action, les mécanismes de résistance connus, les mécanismes de signalisation des dommages. Les mécanismes de mort par apoptose et le rôle de la famille Bcl-2 ainsi qu'un bref rappel sur l'autophagie seront développés dans une troisième partie. Enfin, la famille de l'EGFR sera décrite et l'accent sera mis sur le rôle de l'EGFR dans la résistance. Les différents aspects du HBEGF, le ligand que nous avons pu mettre en évidence au cours de cette étude, seront aussi décryptés.

# **INTRODUCTION**

## A. LE GLIOBLASTOME MULTIFORME

Les gliomes sont les tumeurs primitives du système nerveux central les plus communes (>70%). Le glioblastome multiforme (GBM) est la forme la plus agressive et la plus fréquente des gliomes (Ohgaki et al., 2004). En France, l'incidence annuelle des GBMs est de 4,96 cas pour 100 000 habitants, mais elle est en constante augmentation depuis les trente dernières années (Baldi et al., 2010). Ce phénomène peut notamment s'expliquer par l'amélioration des outils de diagnostique mais aussi par le vieillissement progressif de la population. Le GBM demeure à ce jour un cancer incurable. Une identification moléculaire plus précise de ces tumeurs très hétérogènes permettra à long terme d'aboutir à des thérapies ciblées plus efficaces. En attendant, l'amélioration du traitement de ces tumeurs repose sur la compréhension des mécanismes de résistance associés à la radio/chimiothérapie.

### 1 Origines des GBMs

#### 1.1 Relation entre GBMs et gliomes de bas grade

Les gliomes diffus de bas grade (I et II) sont histologiquement divisés en trois catégories : les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes mixtes. Les oligoastrocytomes mixtes sont caractérisés par des mutations de *TP53*, typique des astrocytomes, et une co-délétion de 1p19q, typique des oligodendrogliomes. Ils ne sont donc pas une entité biologique propre et sont plutôt le reflet de la difficulté du diagnostic histologique des gliomes (van den Bent et al., 2012).

Selon la classification de l'OMS, les GBMs sont des astrocytomes de grade IV, le plus haut grade parmi les tumeurs du tissu neuroépithélial (Louis et al., 2007). On distingue les GBMs primaires ou *de novo* des GBMs secondaires qui eux évoluent à partir des gliomes de bas grade que sont les astrocytomes pilocytiques (grade I), diffus (grade II) et anaplasiques (grade III) (Figure 1).

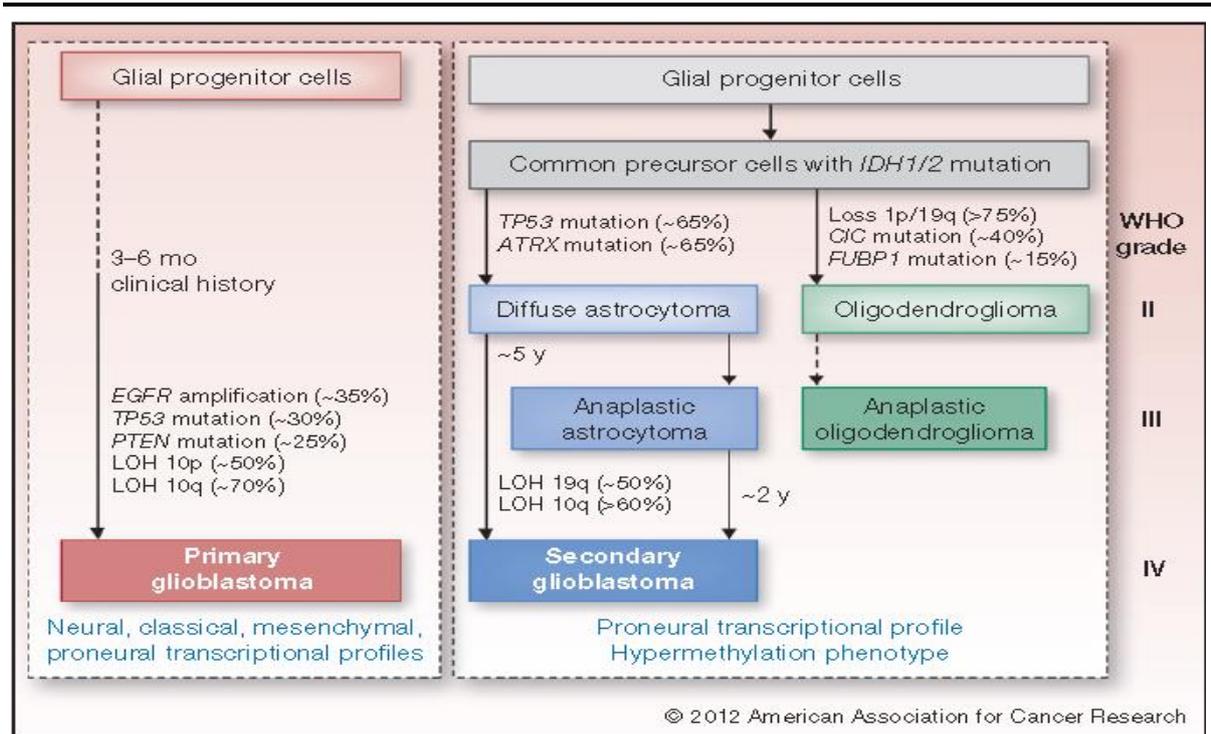
Les gliomes diffus sont caractérisés par des mutations fréquentes d'*IDH1/2* (>80%) qui surviennent à des étapes précoces de la tumorigenèse (Watanabe et al., 2009). Ces mutations sont aussi fréquentes (>80%) dans les GBMs secondaires. La haute fréquence des

mutations d'*IDH1/2* dans les gliomes de bas grade et les GBMs secondaires suggère que ces tumeurs dérivent d'une cellule progénitrice commune. Au contraire, ces mutations sont très rares (<5%) dans les GBMs primaires qui suggèrent que ces GBMs ont un précurseur différent.

## **1.2 Distinctions entre GBMs primaires et secondaires**

Les GBMs primaires et secondaires se développent chez des patients d'âges différents et leur distribution varie entre les sexes. Ils ne sont pas localisés dans les mêmes régions du cerveau et ont des issues cliniques significativement différentes. Les GBMs primaires ou *de novo* sont les plus fréquents (>90%) et se développent rapidement sans que l'on puisse trouver la preuve d'une lésion préexistante. Ils affectent environ trois hommes pour deux femmes avec une moyenne d'âge de 62 ans (Ricard et al., 2012). Les GBMs secondaires comptent pour 10% des GBMs et affectent des patients plus jeunes (en moyenne 45 ans) et touchent autant les hommes que les femmes. L'évolution d'un astrocytome de grade III vers un GBM secondaire se fait en un temps variable allant de quelques mois à 2-3 ans.

Les GBMs primaires et secondaires partagent toutefois des altérations génétiques communes, telles que la mutation de *TP53* et la perte de suppresseurs de tumeurs basés sur le chromosome 10q, qui pourraient expliquer le fait qu'ils soient histologiquement similaires (Figure 1 et 2) (Pour revue : Ohgaki et Kleihues, 2009, 2013).



**Figure 1** Voies des altérations génétiques différenciant GBMs primaires et secondaires. (Ohgaki et Kleihues, 2013)

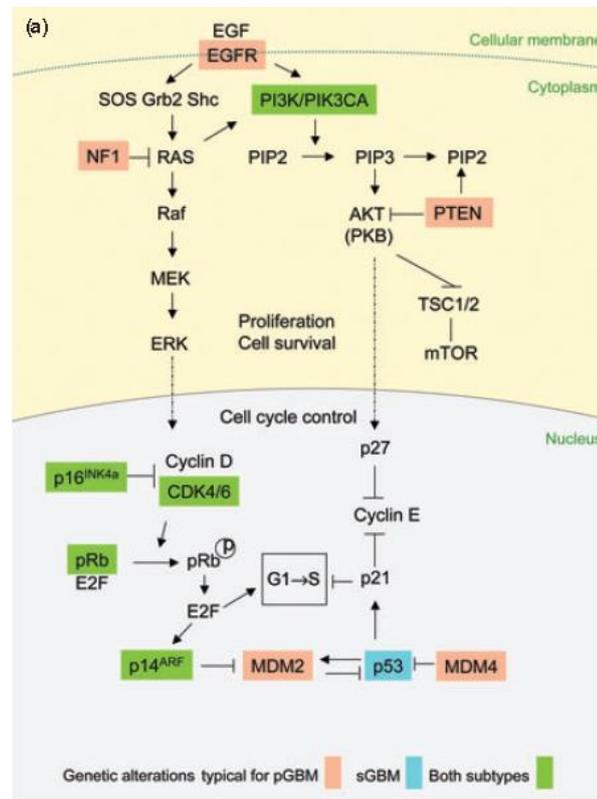
### 1.2.1 Altérations génétiques des GBMs primaires

Les GBMs primaires sont caractérisés par l'amplification fréquente d'*EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) (35-45%) ainsi que la mutation de *PTEN* et la perte du chromosome 10 dans son intégralité. Le gène *PTEN* est muté dans 15-40% des GBMs primaires et très rarement dans les secondaires. Tous les GBMs amplifiés pour *EGFR* présentent une surexpression du récepteur. Cette amplification est souvent accompagnée d'une mutation (60%), la plus courante étant EGFRvIII (délétion des exons 2-7). EGFRvIII est constitutivement activé et exerce ainsi des effets mitogènes. Les GBMs primaires sont mutés pour *TP53* mais beaucoup moins fréquemment que les GBMs secondaires (28% contre 65%). L'amplification d'*EGFR* et la mutation de *TP53* semblent être mutuellement exclusives ce qui laisse sous-entendre deux voies distinctes de tumorigenèse (Ohgaki et Kleihues, 2007; Watanabe et al., 1996).

### 1.2.2 Altérations génétiques des GBMs secondaires

Les GBMs secondaires sont caractérisés par la mutation précoce des gènes *IDH1/2* (Ohgaki et Kleihues, 2013; Watanabe et al., 2009). Le mutant IDH1 modifie le méthylome via

la perturbation directe de l'activité de TET2 (tet methylcytosine dioxygénase 2) et les mutations d'*IDH* et de *TET2* sont mutuellement exclusives dans les leucémies myéloïdes aiguës (Figuroa et al., 2010). De plus l'introduction d'un mutant d'*IDH1* dans des astrocytes primaires humains est suffisante pour déclencher un phénotype hyperméthylé semblable aux astrocytomes de bas grade (Turcan et al., 2012). Ces données récentes montrent l'implication majeure de la mutation d'*IDH1/2* dans la tumorigénèse des astrocytomes et GBMs secondaires et ont entre autres permis de les différencier des GBMs primaires d'un point de vue moléculaire. Les deux événements majeurs de l'évolution d'un astrocytome vers le grade IV sont la mutation de *TP53* puis la perte d'hétérozygotie du brin 10q qui survient plus tardivement.



**Figure 2 Voies de signalisations majeures impliquées dans la pathogénèse des glioblastomes.** (Ohgaki et Kleihues, 2009)

## 2 Classification selon l'étude du *Cancer Genome Atlas Project*

Les GBMs sont histologiquement très hétérogènes, il est donc difficile de les classer. Le *Cancer Genome Atlas Project* a proposé en 2010 une caractérisation moléculaire à partir de deux cents GBMs (Verhaak et al., 2010). Il distingue ainsi les sous-types Proneural, Neural, Classique et Mésoenchymal. Chacun de ces sous-types est associé d'une part à des altérations spécifiques, qui suggèrent des types cellulaires d'origine différente et d'autre part à des réponses différentes vis-à-vis d'une thérapie agressive.

### 2.1 Sous-type Classique

Le sous-type classique présente une amplification du chromosome 7 couplée à une perte du chromosome 10, une forte amplification d'*EGFR* avec une mutation présente pour la moitié des cas. Ce sous-type a une prédilection pour les altérations génomiques. Néanmoins on note une absence flagrante de mutation pour *TP53* et une délétion focale de 9p21.3 ciblant *CDKN2A* (codant pour p16INK4A et p14ARF) qui sont associées à l'amplification d'*EGFR*. A cause de cette amplification focale d'*EGFR*, la voie RB est affectée exclusivement par la délétion de *CDKN2A*. On retrouve aussi une surexpression de NES (marqueur souche) Notch et SHH (sonic hedgehog). La signature génique du sous-type classique est fortement associée aux astrocytes murins.

### 2.2 Sous-type Mésoenchymal

Le sous-type mésoenchymal présente une délétion de 12q11.2 ciblant *NFI* ainsi qu'une comutation de *NFI* et *PTEN* les deux croisant la voie AKT. Comme son nom l'indique il montre une expression de marqueurs mésoenchymateux et des marqueurs d'une transition épithélio-mésoenchymateuse. De plus on retrouve une surexpression de gènes de la super-famille du TNF et NFκB. La signature génique du sous-type mésoenchymal est fortement associée à l'astroglie cultivée in vitro et possède des marqueurs de la microglie.

### 2.3 Sous-type Proneural

Le sous-type proneural est caractérisé par l'altération de *PDGFRA* via l'amplification focale de 4p12 et la mutation ponctuelle d'*IDH1*. La majorité des tumeurs de ce sous-type

présente une mutation de *TP53*, mais seulement la moitié montre un gain du chromosome 7 et une perte du 10. Ce sous-type exprime des gènes de développement oligodendrocytique tels que *PDGFRA* et une surexpression d'*OLIG2* qui entraîne une diminution de p21. De plus il contient des gènes de développement proneural dont l'implication indique une signature cycle cellulaire/prolifération. La signature génique du sous-type proneural est associée aux oligodendrocytes mais pas aux astrocytes.

## 2.4 Sous-type Neural

Le sous-type neural exprime des marqueurs neuronaux. Ces tumeurs peuvent projeter des neurones et des axones et établir des transmissions synaptiques. La signature génique du sous-type neural est associée aux oligodendrocytes et aux astrocytes avec un enrichissement de gènes de neurones.

## 2.5 Sous-types et réponse au traitement

Un traitement agressif de chimio- et radiothérapie montre une réponse significative dans les sous-types classique et mésenchymal. Bien qu'il semble y avoir une efficacité dans le sous-type neural, la survie des GBMs correspondant au sous-type proneural ne semble pas affectée. La répression épigénétique de l'O-6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT) via la méthylation de son promoteur réduit la résistance aux agents alkylants. Dans cette étude le statut de méthylation du promoteur de *MGMT* n'est associé avec aucun sous-type. De plus des tumeurs récurrentes sont retrouvées dans les quatre sous-types et les données de Murat *et al.* suggèrent que ces tumeurs ne changent pas de sous-type après la récurrence (Murat et al., 2008).

Ces données offrent pour la première fois une classification histomoléculaire des GBMs dont la pertinence clinique reste à démontrer bien que différentes pistes soient suggérées par le Cancer Genome Atlas Project.

## **3 Traitement du Glioblastome**

### **3.1 Traitement conventionnel**

Le GBM reste une maladie incurable et seules quelques améliorations modestes de la survie des patients ont été faites au cours des dernières décennies. Au moment du diagnostic, le traitement conventionnel consiste en une résection chirurgicale maximale. Tant que la zone du cerveau le permet une résection étendue est recommandée car elle diminue les symptômes d'effet de masse, augmente la survie et accroît l'efficacité des thérapies adjuvantes (Frank Marko et al., 2013; Ricard et al., 2012). La survie moyenne après une résection seule est inférieure à 12 mois, indiquant par là même un besoin essentiel de traitements additionnels (Dresemann, 2010).

La résection est donc suivie d'une radiothérapie avec témozolomide (TMZ) concomitant puis de témozolomide adjuvant seul (Stupp et al., 2005). La combinaison radiothérapie/TMZ donne une médiane de survie de 14,6 mois, une survie à 2 ans de 27,2% et une survie à 5 ans de 9,8% contre 10,9% et 1,9% pour la radiothérapie seule (Stupp et al., 2009). Avec ce protocole basé sur la radiothérapie et le TMZ (aujourd'hui référé comme le protocole Stupp), une augmentation des survivants à 5 ans a été observée.

La carmustine (BCNU) peut aussi être employée pour traiter les GBMs. Des polymères contenant le BCNU sont implantés pendant la résection puis le traitement est suivi d'une radiothérapie. Ce protocole augmente la survie globale des patients mais la survie à 2 et 5 ans reste inférieure à celle reportée par le protocole Stupp. Il existe en plus des complications dues à des effets secondaires (Westphal et al., 2006).

### **3.2 GBMs et Rechute**

Au vu du faible nombre de survivants à long terme, il est maintenant admis que la résurgence de la tumeur est un fait inévitable dont la prise en charge est dépendante de chaque cas traité (Hou et al., 2006). Face à une inefficacité thérapeutique complète, la survie des patients en rechute est très faible. Pour des raisons évidentes de localisation, il est difficile de réopérer les GBMs, mais les chirurgiens qui tentent une deuxième résection, augmentent la survie des patients réfractaires à la radio/chimiothérapie (Chaichana et al., 2012). Il faut néanmoins prendre en compte le risque de morbidité post-opératoire qui est très grand chez

des patients avec un indice de Karnofsky inférieur à 70% (c'est-à-dire des patients exigeants une assistance médicale continue) (De Bonis et al., 2012).

L'utilisation du TMZ reste la seule solution dans les cas de GBMs en récurrence notamment parce qu'il augmente les indices de qualité de vie du patient (Darkes et al., 2002). Il est même actuellement recommandé d'utiliser un régime métronomique et de fortes doses journalières (>100 mg/m<sup>2</sup>) afin d'augmenter son efficacité (Chen et al., 2012).

Durant cette dernière décennie, l'utilisation du protocole Stupp a permis d'augmenter la survie moyenne des patients de 6 mois à plus d'un an. Ce succès reste relatif et la rémission est aujourd'hui encore un objectif impossible à atteindre. Devant cette impasse thérapeutique il existe un besoin urgent d'améliorer le traitement des GBMs. Cet objectif passe par l'amélioration de nos connaissances sur les mécanismes de mort provoqués par le TMZ et l'identification des acteurs de la résistance au traitement. Les chapitres ci-après traiteront des mécanismes d'action du TMZ et de ses effets sur les dommages de l'ADN et sur le déclenchement de la mort. Le troisième chapitre décrira l'apoptose et fera un bref point sur l'autophagie. Cette introduction finira sur l'implication d'EGFR et de ses ligands dans la résistance au traitement.

## **B. LE TEMOZOLOMIDE : DES LESIONS DE L'ADN AUX MECANISMES DE RESISTANCE**

Les agents génotoxiques méthylants sont couramment retrouvés dans l'environnement, le tabac ou produits lors de processus métaboliques endogènes. Ils causent des mutations lors de la réplication de l'ADN, mais leur quantité est insuffisante pour induire l'apoptose ce qui les rend hautement carcinogènes. Paradoxalement, les agents méthylants, (tels que la procarbazine, la dacarbazine, la streptozotocine et le TMZ), employés à forte dose provoquent des lésions importantes de l'ADN et induisent l'apoptose des cellules cancéreuses.

### **1 Le TMZ : un agent méthylant**

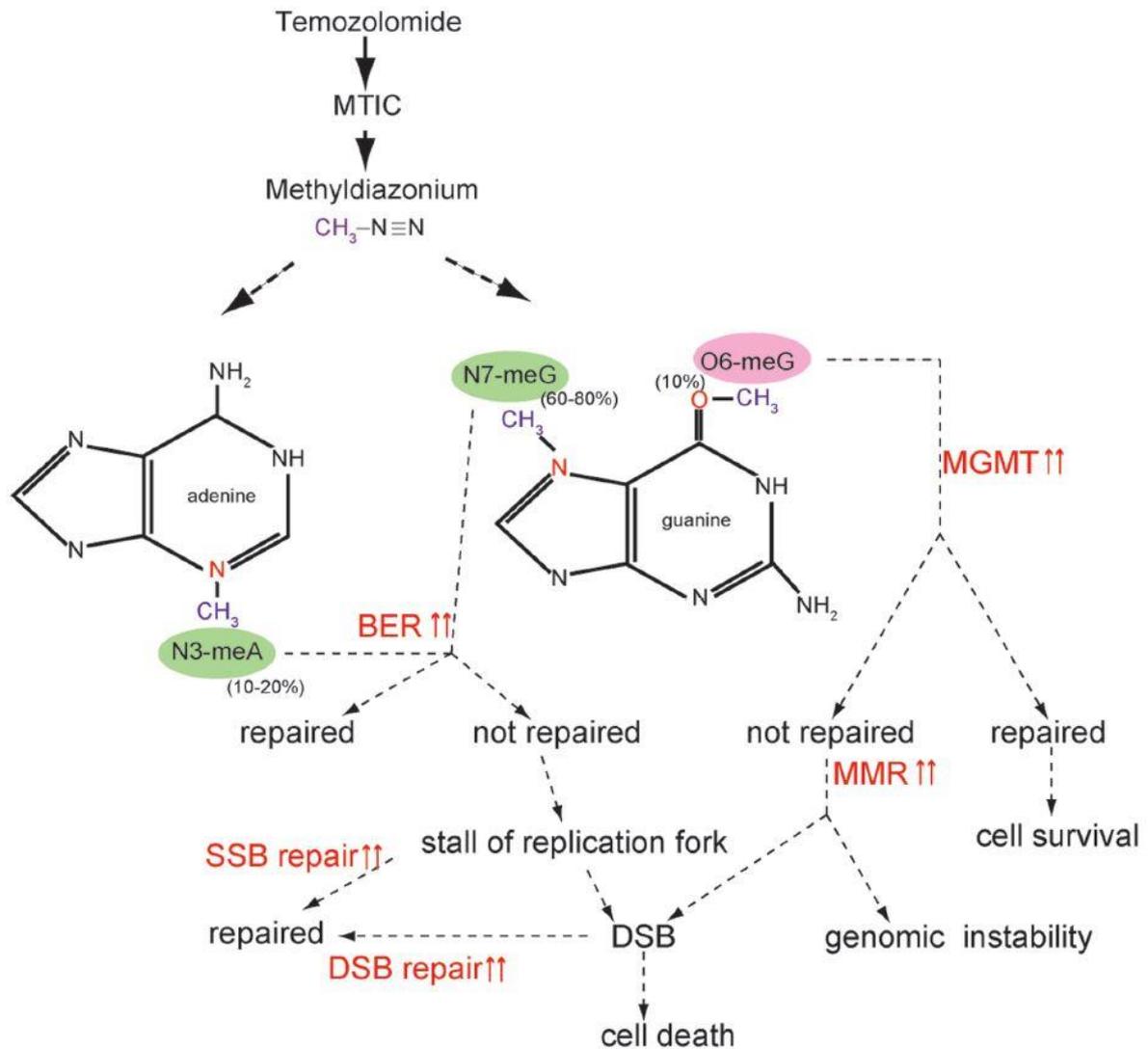
#### **1.1 Généralités**

Le TMZ est la proforme d'un agent méthylant de la classe des imidazoles, c'est un dérivé de la dacarbazine. C'est une molécule lipophile de petite taille (194 Da) stable à pH acide ce qui autorise une administration orale, pratique chez des patients souvent âgés. Ses caractéristiques lui permettent de passer facilement la barrière hémato-encéphalique qui est le facteur limitant dans la chimiothérapie des gliomes. Au dessus de pH 7, le TMZ devient spontanément actif. Les tumeurs cérébrales ont un pH plus alcalin que les tissus sains environnants, ce qui favorise une activation au niveau du tissu tumoral (Pour revue Marchesi et al., 2007).

#### **1.2 Mécanisme d'action du TMZ**

Après une absorption rapide le TMZ se transforme spontanément en monométhyltriazène (MTIC). Le MTIC réagit ensuite avec l'eau pour donner le 5-aminoimidazol-4-carboxamide (AIC) et ainsi présenter un cation methyldiazonium hautement réactif. Une fois activé, le TMZ méthyle préférentiellement les bases puriques de l'ADN en position N<sup>7</sup> des guanines dans les régions riches en guanines (N<sup>7</sup>-MeG ; 60-80%), mais il

méthyle aussi en position N<sup>3</sup> des adénines (N<sup>3</sup>-MeA ; 10-20%) et en position O<sup>6</sup> des guanines (O<sup>6</sup>-MeG ; 5-10%) (Tentori and Graziani, 2002) (Figure 3).



**Figure 3 Mécanismes de cytotoxicité du TMZ et voies de réparation de l'ADN activées.** (Yoshimoto et al., 2012)

Les méthylations N<sup>7</sup>-MeG et N<sup>3</sup>-MeA sont les plus abondantes et induisent un arrêt de la fourche de réplication. Elles sont rapidement réparées via la réparation par excision de base (base excision repair, BER). Les N<sup>7</sup>-MeG ne sont pas cytotoxiques en revanche les lésions N<sup>3</sup>-MeA sont létales pour la cellule si elles ne sont pas réparées. La cytotoxicité des lésions provoquées par le TMZ dépend donc du système de réparation cellulaire mais elle est généralement due aux méthylations en position O<sup>6</sup> des guanines (Drablos, 2004).

## 2 Résistance aux lésions O<sup>6</sup>-MeG causées par le TMZ dans les gliomes

Les O<sup>6</sup>-MeG peuvent être directement réparées si la cellule exprime l'enzyme MGMT (methyl-guanine methyl transferase). Sinon, les O<sup>6</sup>-MeG provoquent un mésappariement avec la thymine (et non la cytosine) pendant la réplication de l'ADN ce qui déclenche le système de réparation des mésappariements (mismatch repair, MMR). Le MMR ne reconnaît exclusivement que la thymine et l'excise, l'O<sup>6</sup>-MeG restant en place sur le brin opposé. Ainsi plusieurs cycles futiles d'excision puis de réinsertion de la thymine s'enchaînent causant des cassures simple brin de l'ADN. Ces cassures entraînent l'effondrement de la fourche de réplication et la formation de cassures double brin de l'ADN (Mojas et al., 2007). L'absence de MGMT et un MMR fonctionnel sont donc les deux conditions indispensables à la cytotoxicité du TMZ par les O<sup>6</sup>-MeG (Figure 4).

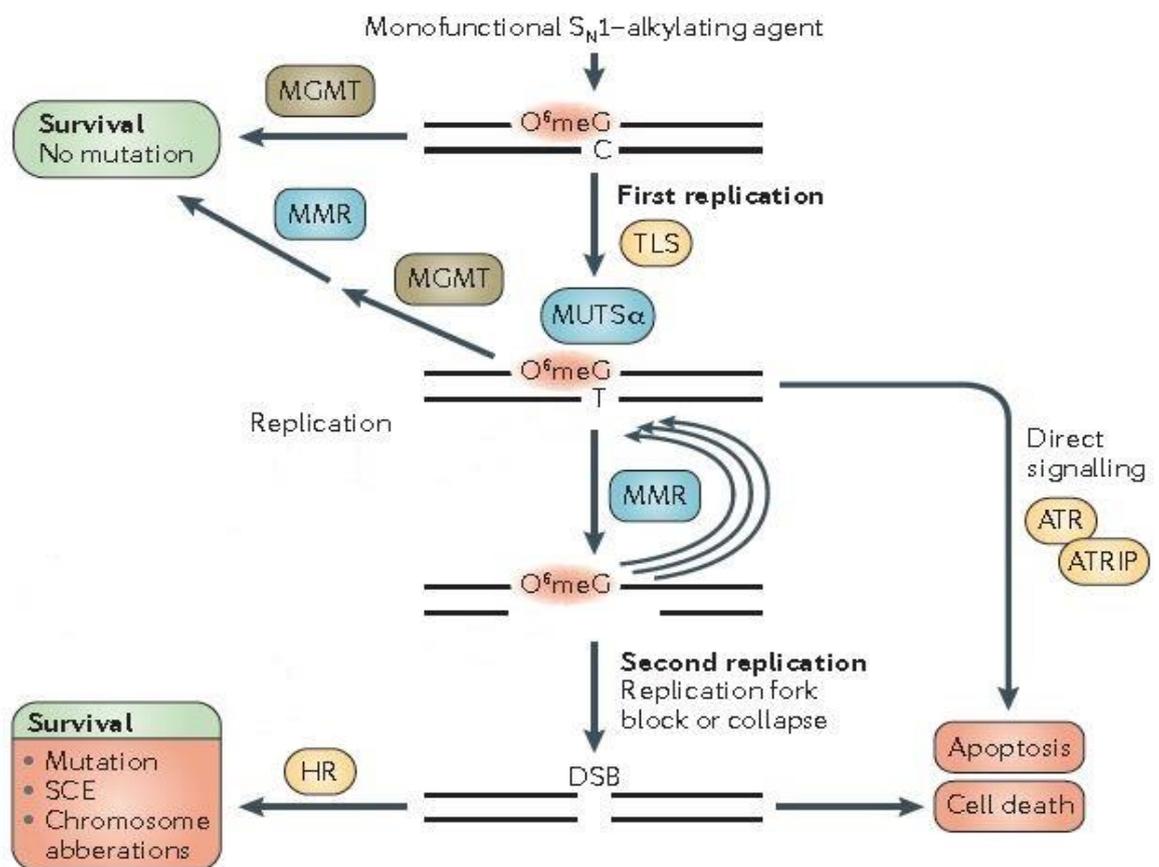
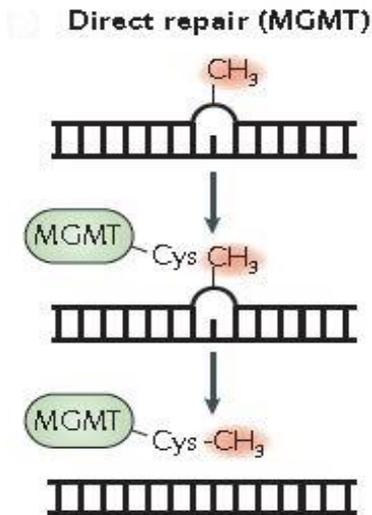


Figure 4 Prise en charge des lésions O<sup>6</sup>-methylguanine. (Fu et al., 2012)

## 2.1 Réparation directe : la MGMT

### 2.1.1 Mécanisme d'action

La MGMT ou AGT (alkylguanine-DNA alkyl-transférase) est capable de retirer les groupements méthyl en position O6 des guanines en une seule étape et cela sans avoir besoin d'une autre protéine ou cofacteur (Figure 5). Outre sa préférence pour les groupements méthyl, la MGMT peut réparer des groupements éthyl, propyl, butyl, benzyl, et 2-chloroéthyl d'où le terme d'alkyltransférase (Coulter, 2007). Le groupement méthyl est transféré de la guanine vers la cystéine 145 du site actif par une réaction stœchiométrique qui inactive l'enzyme. Elle est alors dégradée par le protéasome (Pegg, 1995).



**Figure 5 Réparation par MGMT.** (Fu et al., 2012)

### 2.1.2 Expression de la MGMT

La MGMT est normalement retrouvée en grande quantité dans le foie et est exprimée en faible quantité dans le cerveau (Verbeek et al., 2008). Dans les tumeurs, la MGMT existe en forte concentration dans les cancers du sein, des ovaires et des poumons alors qu'elle est peu active dans les cancers du pancréas ou les mélanomes malins. Dans le cas des gliomes, il existe une large variabilité, cependant il existe une très forte corrélation entre son expression et la résistance aux agents alkylants. En ce qui concerne le GBM, le lien entre l'expression de la protéine et la résistance n'a pas été clairement établi. La seule corrélation communément acceptée est celle de la méthylation du promoteur de *MGMT* avec la réponse au TMZ ce qui en fait le premier marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie par agents alkylants (Karayan-Tapon et al., 2010).

L'inactivation du gène *MGMT* est un événement épigénétique courant dans la tumorigenèse. La méthylation épigénétique (à ne pas confondre avec la méthylation du TMZ sur l'ADN) est effectuée sur les cytosines situées dans des îlots CpGs grâce aux DNMTs (DNA methyltransférases). L'hyperméthylation des îlots CpGs du promoteur de *MGMT* inhibe la fixation des facteurs de transcription et permet l'extinction du gène. Entre 45 et 70% des patients nouvellement diagnostiqués pour le GBM présentent une méthylation de *MGMT*.

Cette méthylation est associée avec un bénéfice de survie significatif après un traitement TMZ et radiothérapie comparé à la radiothérapie seule. Cependant l'analyse de l'expression de MGMT dans les gliomes par immunocytochimie ou par test d'activité enzymatique donne des résultats contradictoires. L'hétérogénéité des biopsies de gliomes est encore un autre facteur compliquant la tâche. Il est possible que la méthylation du promoteur de *MGMT* ne soit qu'un marqueur d'un dérèglement épigénétique plus général suggérant que d'autres gènes puissent être plus pertinents vis-à-vis du résultat clinique.

L'expression de MGMT survient après des dommages à l'ADN or le gène *MGMT* possède en son promoteur un site de fixation pour le facteur de transcription p53. Plusieurs études montrent que p53 serait essentiel à l'expression de MGMT. Par ailleurs une étude récente montre que l'induction de l'expression de MGMT par p53 et NFκB compense la déplétion induite par la O<sup>6</sup>-benzylguanine (Vlachostergios et al., 2013).

### **2.1.3 Inhibition de la MGMT**

L'introduction d'O<sup>6</sup>-methylguanine avant le traitement par agent alkylant a été la première tentative d'inhibition de la MGMT. Peu efficace, l'O<sup>6</sup>-methylguanine a rapidement été remplacée par la O<sup>6</sup>-benzylguanine (O<sup>6</sup>-BG), deux mille fois plus efficace (Rabik et al., 2006). L'O<sup>6</sup>-BG joue le rôle de substrat alternatif pour la MGMT et inactive l'enzyme. *In vitro*, l'administration d'O<sup>6</sup>-BG épuise en quelques minutes les stocks cellulaires de MGMT et améliore ainsi la cytotoxicité des agents alkylants.

La combinaison O<sup>6</sup>-BG plus TMZ a été étudiée dans deux essais cliniques de phase II, l'un pour le traitement de gliomes pédiatriques (Warren et al., 2012) et l'autre de GBMs et de gliomes anaplasiques résistants au TMZ (Quinn et al., 2009). Une restauration de la sensibilité au TMZ a pu être observée dans les gliomes résistants mais pas dans les GBMs.

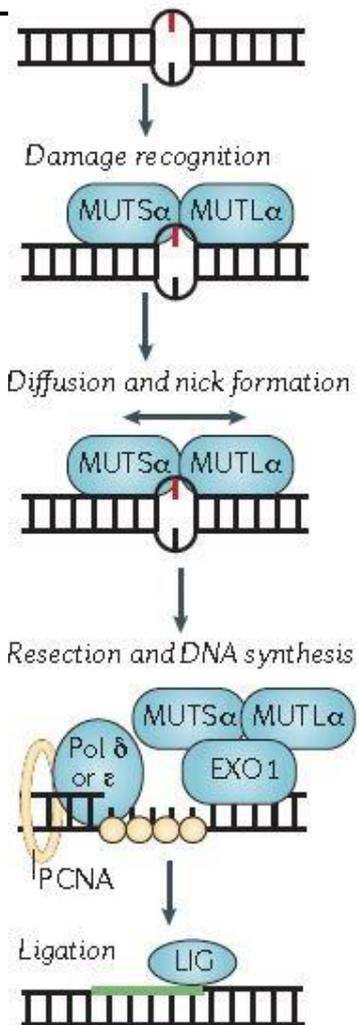
## **2.2 Défaut de réparation MMR**

La réparation des mésappariements (MMR) reconnaît et corrige les bases mal appariées durant la synthèse de l'ADN. Ce mécanisme est fondamental dans la cytotoxicité induite par les O<sup>6</sup>-MeG. La reconnaissance des mésappariements O<sup>6</sup>-MeG:T par la sous unité MutSα (qui est composée de MSH2 et MSH6) de la voie MMR est une étape cruciale pour l'initiation de la mort programmée en réponse aux dommages par les alkylations (Duckett et al., 1996) (Figure 4, 6). En effet l'activation du dimère MSH2/MSH6 entraîne une boucle de

délétion/insertion qui *in fine* produit des cassures double brin et déclenche l'apoptose. Le statut MMR influence donc la réponse aux génotoxiques et la cytotoxicité induite par le TMZ dépend d'une MMR fonctionnelle. Des mutations de *MSH6* sont fréquemment retrouvée dans les GBMs récurrents ayant été traités au TMZ en première ligne (Yip et al., 2009). Dans des cellules mutées pour *MSH6* les O<sup>6</sup>-MeG ne sont pas reconnues. Là où l'absence de MGMT sensibilise les cellules, la perte d'une MMR fonctionnelle permet à la cellule de tolérer les lésions et de continuer dans son cycle. La survie est donc contrebalancée par une mutagenèse excessive.

En plus d'être responsable des cassures double brin, la reconnaissance des mésappariements O<sup>6</sup>-MeG par la MMR peut servir de senseur des dommages par alkylation. MutS $\alpha$  peut directement interagir avec ATR et l'activer en réponse aux adduits O<sup>6</sup>-MeG (Yoshioka et al., 2006).

La conversion des O<sup>6</sup>-MeG en cassures double brin est donc le principal déclencheur de la mort par apoptose. Le destin de la cellule est donc dépendant de la signalisation de ces dommages et de la balance entre réparation et induction de la mort.



**Figure 6**  
**Réparation MMR.**  
(Fu et al., 2012)

### 3 Signalisation et réparation des dommages double brin de l'ADN induits par le TMZ

Les événements potentiellement létaux pour la cellule sont les cassures doubles brins (double-strand breaks, DSBs) et les lésions qui perturbent la réplication et la transcription de l'ADN. Les cellules sont capables de reconnaître ces lésions grâce à des senseurs qui recrutent des transducteurs du signal que sont les protéines kinases ATM, ATR et DNA-PK. Ces transducteurs vont signaler l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation du point de contrôle et la

réparation de l'ADN via divers effecteurs. Si la réparation de l'ADN échoue ou est dépassée par le nombre de lésions, l'apoptose de la cellule est alors déclenchée.

### **3.1 Transducteurs de la signalisation des dommages**

Les dommages à l'ADN induits par le TMZ activent les deux principaux acteurs de la transduction du signal de réparation des dommages de l'ADN, ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ATM and Rad3 related) et déclenchent l'apoptose de la cellule (Caporali et al., 2004). ATM et ATR sont des sérines/thréonines kinases de la famille des PIKK (comme Akt) qui phosphorylent une multitude de protéines et induisent la réponse aux dommages de l'ADN. ATM et ATR sont impliqués dans trois fonctions que sont la régulation et l'induction de la réparation des DSBs, l'activation du point de contrôle du cycle cellulaire et le signalement de l'apoptose. Le TMZ induit en effet un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M qui apparaît dans le deuxième cycle après le traitement. La décision de vie ou de mort de la cellule en réponse aux génotoxiques dépend des fonctions d'ATM et d'ATR qui peuvent se croiser mais qui ne sont pas redondantes (Stiff et al., 2006).

#### ***3.1.1 Signalisation par ATM***

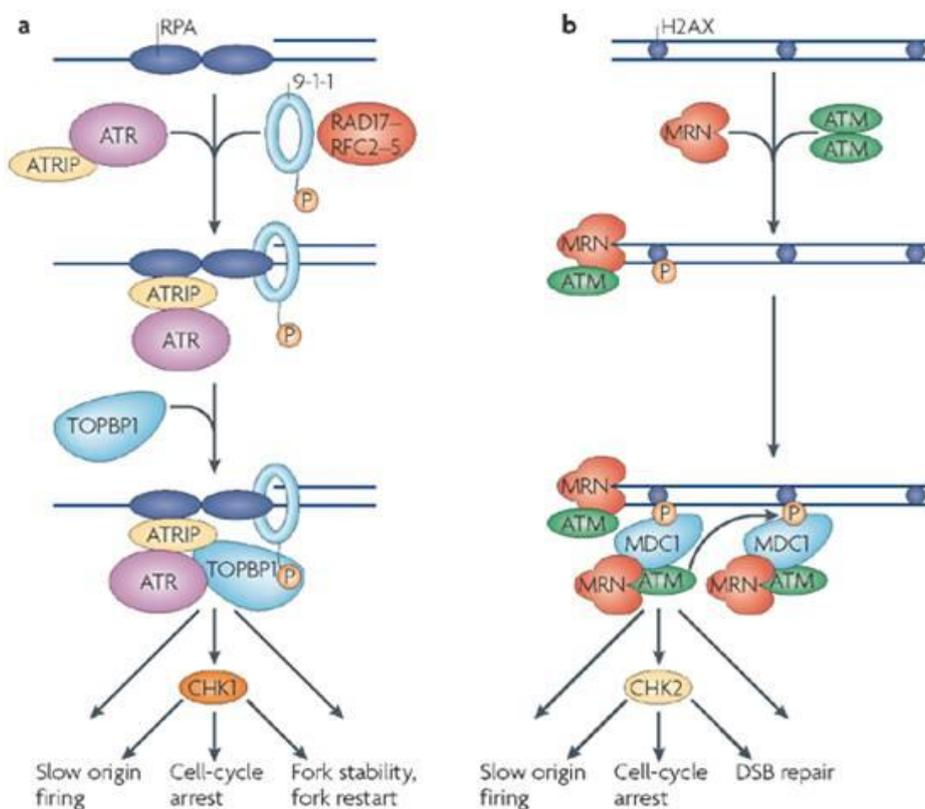
ATM est principalement activé par les DSBs issus de l'irradiation ou indirectement par les agents méthylants qui par un blocage soutenu de la réplication, vont provoquer l'effondrement de la fourche de réplication (Caporali et al., 2004; Yoshida et al., 2008). La détection des DSBs requiert la coopération d'ATM et du complexe MRN. Le complexe MRN est constitué de NBS1 qui est responsable du transport du complexe dans le noyau, MRE11 qui possède les activités endo- et exonucléase et RAD50 qui peut lier l'ADN (van den Bosch et al., 2003). Une fois le complexe MRN localisé sur la DSB, ATM est recruté puis activé par autophosphorylation (Figure 7b).

#### ***3.1.2 Signalisation par ATR***

ATR est activé par des structures situées sur de l'ADN simple brin et sur les jonctions entre ADN simple brin et ADN double brin. De ce fait les structures appropriées à l'activation d'ATR sont très certainement présentes lors d'un arrêt de la fourche de réplication dû à une réparation par excision de nucléotide (base excision repair, BER) (Cimprich and Cortez, 2008). Les dommages induits par l'irradiation et les agents méthylants sont capables de bloquer la fourche de réplication et donc d'activer ATR (Caporali et al., 2004; Pabla et al.,

2008). La protéine RPA (replication protein A) se lie à l'ADN simple brin lors de la réplication, c'est elle qui va recruter ATR par l'intermédiaire d'ATRIP (ATR interacting protein) (Zou and Elledge, 2003). Sur les sites de jonction entre ADN simple brin et ADN double brin se trouve le complexe 9-1-1 (Rad9, Hus1, Rad1). Lors de l'arrêt de la fourche de réplication, le complexe 9-1-1 recrute TOPBP1 qui active directement ATR-ATRIP (Lee et al., 2007) (Figure 7a).

ATM et ATR ne travaillent pas indépendamment puisque la phosphorylation de TOPBP1 par ATM est essentielle à l'activation d'ATR (Yoo et al., 2007). De plus le complexe MRN est impliqué dans le recrutement de TOPBP1 (Duursma et al., 2013).



**Figure 7** Modèle simplifié de l'activation d'ATM et d'ATR Recrutement et signalisation (a) d'ATR après l'arrêt de la fourche de réplication et (b) d'ATM après l'apparition de dommages doubles brins.

## 3.2 Cibles de phosphorylation d'ATM et ATR

Les cibles de phosphorylation les plus importantes d'ATM et ATR sont Chk1, Chk2 (checkpoint kinase-1, -2) et p53. ATM phosphoryle Chk2 après la formation de DSBs sur la thréonine 68 (Ahn et al., 2000) tandis qu'ATR phosphoryle Chk1 sur la sérine 345 après l'arrêt de la fourche de réplication (Guo et al., 2000). Chk1 et Chk2 phosphorylent à leur tour le facteur de transcription p53 sur la sérine 20, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle (Shieh et al., 2000).

### 3.2.1 Rôle de p53

En régulant à la fois l'expression de gènes pro- et antiapoptotiques, p53 augmente la réparation de l'ADN et sensibilise la cellule à l'apoptose. Les gènes proapoptotiques régulés par p53 sont *Fas-R*, *Bax*, *Puma*, *Noxa*, *Apaf-1*, *caspase-9* et *Pidd*, ils codent pour des protéines en aval de la DDR (*DNA damage repair*). À l'inverse les gènes antiapoptotiques régulés par p53, *DDBZ*, *XPC*, *Fen1*, *MGMT* et *MSH2* codent pour des protéines en amont de la réparation de l'ADN (Pour revue Jänicke et al., 2008; Stegh, 2012). La décision de p53 de stimuler la réparation ou l'apoptose dépend certainement de la dose mais aussi du type de génotoxique.

Lors de lésions de l'ADN, Akt peut être activé notamment en réponse à des facteurs de croissance et supprimer p53. Akt se lie à l'ubiquitine E3 ligase Mdm2 et la phosphoryle sur les sérines 166 et 186, provoquant son importation nucléaire et l'augmentation de son activité ubiquitine ligase menant ainsi à l'inactivation de p53 (Gottlieb et al., 2002). La mutation ou la perte de PTEN, l'inhibiteur d'Akt, dans les cellules cancéreuses est un événement fréquent qui augmente leur seuil de résistance aux lésions et donc leur seuil de déclenchement de l'apoptose. Deux issues sont alors possibles, la cellule peut mourir par nécrose ou bien elle est capable d'outrepasser les dommages, ce qui augmente les risques de mutation et de tumorigénèse.

Au-delà de ce point de vue p53-centrique, il est évident que d'autres voies indépendantes de p53 sont stimulées par la réparation. Pour preuve, une analyse protéomique à grande échelle a révélé plus de 700 protéines pouvant potentiellement être phosphorylées en réponse aux dommages de l'ADN sur des sites consensus reconnus par ATM et ATR (Matsuoka et al., 2007).

### ***3.2.2 Phosphorylation de l'histone 2AX***

Les DSBs et l'arrêt de la fourche de réplication provoquent la phosphorylation de l'histone 2AX sur la sérine 139 (H2AX désigne la forme inactive et  $\gamma$ H2AX la forme phosphorylée) via ATM, ATR ou DNA-PK (Figure 8). Les foci  $\gamma$ H2AX se localisent autour des DSBs en seulement quelques minutes et la quantité de foci atteint son maximum en environ une heure (Nakada et al., 2008). La déphosphorylation de  $\gamma$ H2AX, marquant la réparation des DSBs des foci est due à l'activité des phosphatases PP2A et PP4C (Chowdhury et al., 2005; Nakada et al., 2008). La fonction présumée de  $\gamma$ H2AX est de faciliter la signalisation des DSBs, probablement en rendant la chromatine plus accessible pour la réparation (Kruhlak et al., 2006). Il est généralement accepté que les DSBs de l'ADN induisent la formation de foci  $\gamma$ H2AX, cependant H2AX peut être phosphorylée en réponse à d'autres lésions de l'ADN. Pour exemple, les radiations aux ultraviolets induisent la phosphorylation de H2AX via ATR (Stiff et al., 2006). Dans ce cas,  $\gamma$ H2AX n'apparaît pas sous forme de foci mais présente plutôt un marquage diffus.

La protéine chaperonne MDC1 se lie à  $\gamma$ H2AX et orchestre la plupart de ses fonctions notamment en recrutant le complexe de réparation MRN (Mre11/Nbs1/Rad50) (Chapman and Jackson, 2008), mais aussi d'autres protéines de réparation telles que BRCA1/BARD1 et 53BP1 (Paull et al., 2000; Wang et al., 2002).

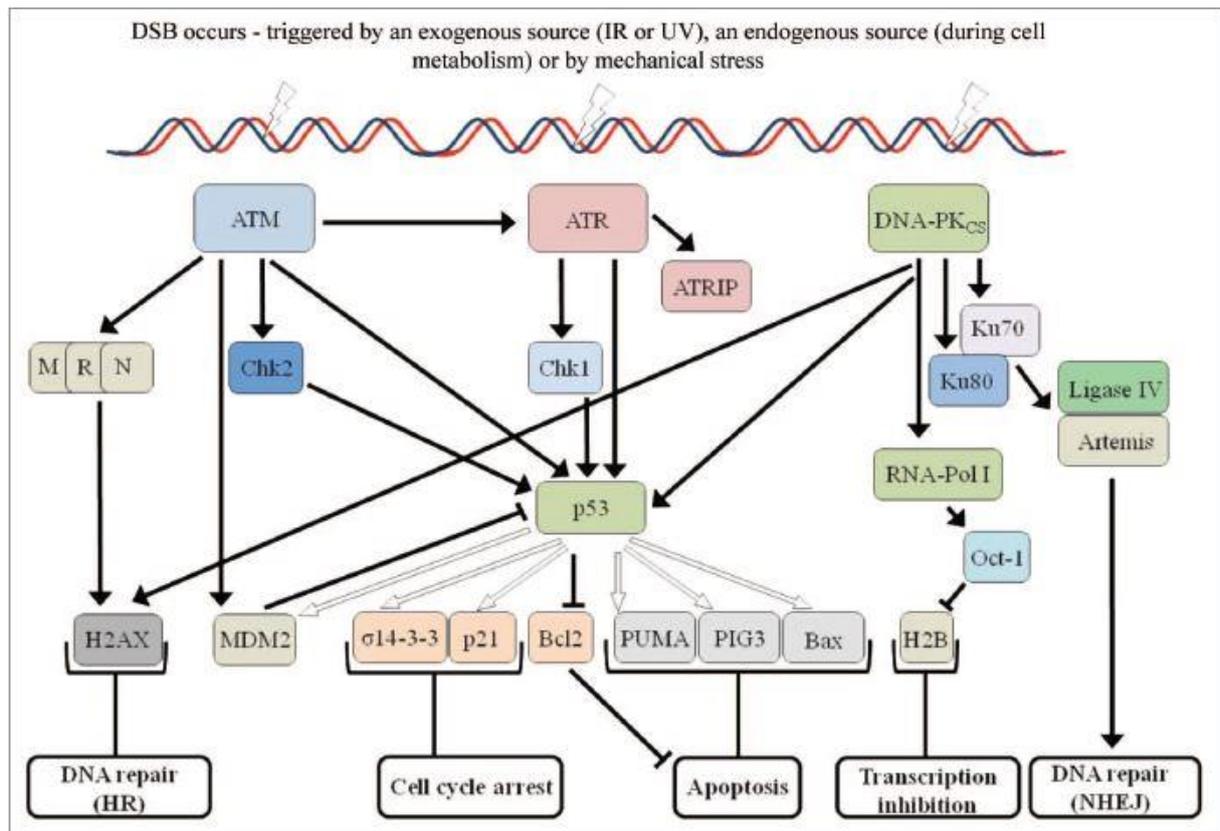


Figure 8 Voies de transduction de la signalisation des DSBs. (Hill and Lee, 2010)

### 3.3 Réparation des cassures double brin de l'ADN

La réparation des cassures double brin est assurée par deux systèmes principaux : la recombinaison homologue (RH) qui a besoin d'une matrice homologue à la séquence d'ADN endommagé et la réparation NHEJ (non homologous end joining) qui ligature simplement les deux extrémités de l'ADN cassé.

#### 3.3.1 Recombinaison homologue

La recombinaison homologue est le mécanisme le plus important pour les cellules en cours de réplication. L'activité de plusieurs composants de la recombinaison homologue est par ailleurs régulée par des CDKs spécifiques des phases S et G2 du cycle cellulaire (Jazayeri et al., 2006). En effet, la recombinaison homologue s'appuie sur la chromatide sœur du brin endommagé comme matrice de réparation, elle ne peut donc avoir lieu que lorsque l'ADN est répliqué. De ce fait, la recombinaison homologue est un processus de réparation fidèle mais qui demande beaucoup de temps (Thompson et Schild, 2001). De par leur taille, les génomes

de mammifères sont fréquemment réparés par NHEJ lors des phases S et G2 (Mao et al., 2008).

### **3.3.2 DNA-PK et la NHEJ**

La NHEJ est plus rapide et plus simple que la recombinaison homologue et peut être effectuée à n'importe quelle étape du cycle cellulaire. La NHEJ peut réparer des DSBs en 30 minutes là où la recombinaison homologue peut prendre 7 heures (Mao et al., 2008). La contrepartie est que la NHEJ est source de mutation puisqu'elle peut réparer des bouts d'ADN altérés ou incompatibles (Lieber, 2010).

La NHEJ est stimulée par l'activation de DNA-PK en réponse aux DSBs. DNA-PK (DNA dependent kinase) fait partie de la même famille qu'ATM et ATR mais son rôle se restreint à la stimulation des activités de réparation localement sans déclencher de réponse cellulaire. Tout comme ses homologues ATM et ATR, DNA-PK possède les mêmes capacités de phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine de ses cibles. DNA-PK est composé de trois composants clés, Ku70, Ku80 et DNA-PKcs (DNA-PK catalytic subunit) (Hill and Lee, 2010). Le dimère Ku70/Ku80 stabilise les deux bouts d'ADN double brin et recrute DNA-PKcs (Critchlow et Jackson, 1998; Smith et Jackson, 1999). Les protéines effectrices de la NHEJ vont alors pouvoir être activées au sein du complexe ligaseIV-XRCC4-XLF. DNA-PKcs régule donc ce mécanisme de réparation rapide pour les cassures « faciles » à réparer sans qu'il y ait activation du point de contrôle de l'ADN. En revanche, si les DSBs sont trop nombreux, ATM active alors la recombinaison homologue et enclenche le point de contrôle.

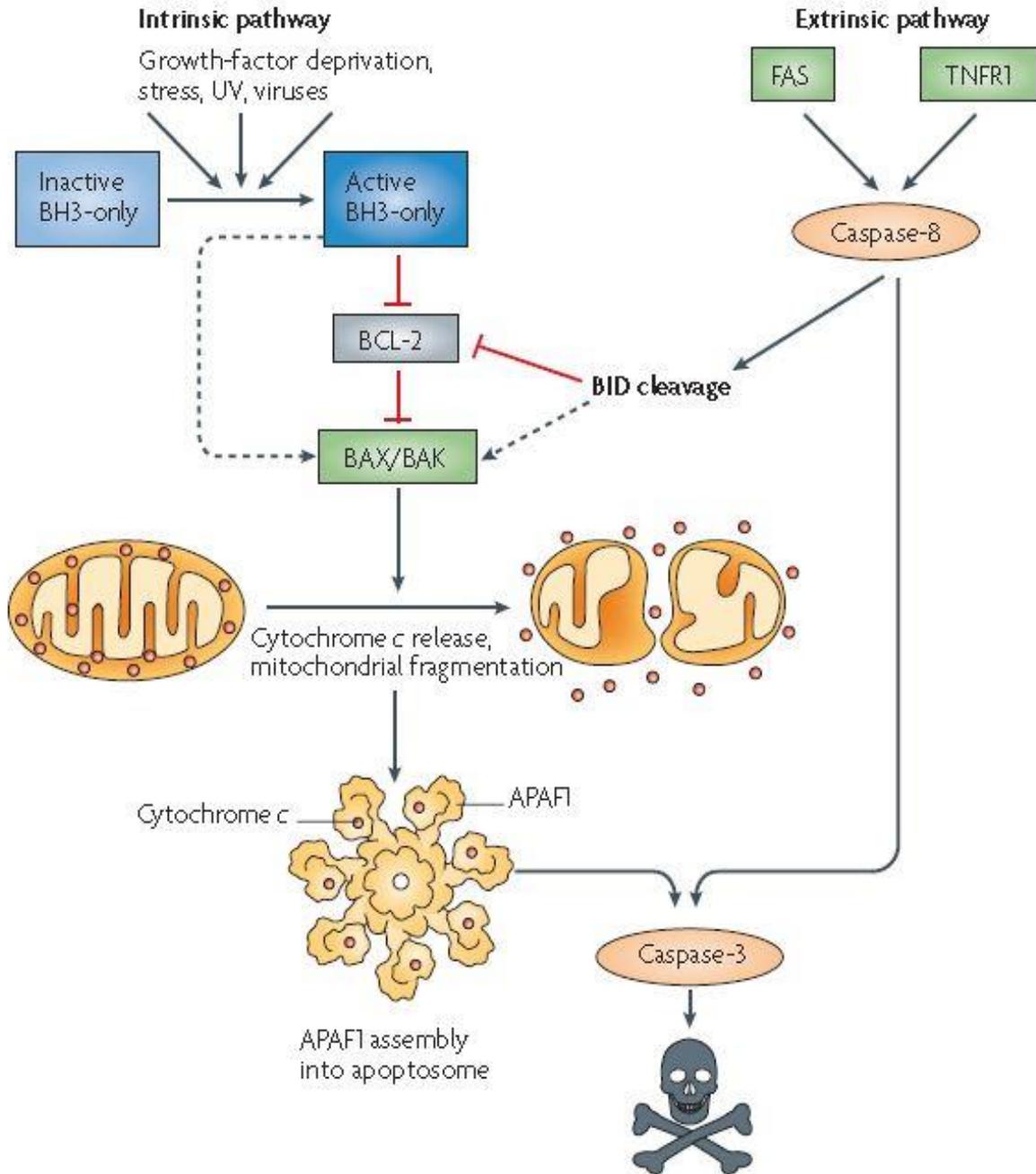
Lorsque les dommages ne peuvent être réparés un signal de mort est alors déclenché. Le TMZ induit trois types de réponse cellulaire dans les cellules de GBM : l'apoptose, l'autophagie et la sénescence, il induit très peu de nécrose. Ces réponses sont intrinsèquement liées et la décision de survie ou de mort dépend de la balance entre apoptose, autophagie et sénescence. Le chapitre suivant va développer tout particulièrement l'apoptose et fait aussi un point rapide sur l'autophagie.

## C. L'APOPTOSE ET LA FAMILLE BCL-2

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui a été conservée au cours de l'évolution. Elle se caractérise morphologiquement par un rétrécissement de la cellule sur elle-même, une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau et un bourgeonnement cellulaire (blebbing) conduisant à la formation de corps apoptotiques (Kerr et al., 1972). La cellule expose alors la phosphatidylsérine tout en gardant son intégrité cellulaire. Elle est alors reconnue par les macrophages et est éliminée sans déclencher de réaction inflammatoire. Toutes les voies d'activation de l'apoptose convergent vers l'activation des caspases (aspartic-acid-specific cystein proteases), protéases à cystéine, qui coordonnent le démantèlement cellulaire. On distingue deux voies d'activation de l'apoptose, la voie intrinsèque et extrinsèque (Figure 9).

### 1 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque se déclenche suite à l'activation de récepteurs de mort présents à la surface de la cellule. Ces récepteurs font parties de la famille du récepteur au TNF (tumor necrosis factor) comme le TNFR1 ou Fas (Schulze-Osthoff et al., 1998). Ils ont en commun un domaine de mort (death domain, DD) qui leur permet de recruter et d'activer la caspase-8 (caspase activatrice) via la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain). Ce recrutement entraîne l'induction de la mort par l'activation des caspases effectrices telles que la caspase-3, -6 ou -7 de manière indépendante de la famille Bcl-2 et de la mitochondrie (Thorburn, 2004). La voie extrinsèque s'entrecroise avec la voie intrinsèque via le clivage et l'activation par la caspase-8 de la protéine pro-apoptotique à BH3-seul BID. Ainsi la partie C-terminale de la forme tronquée de BID (tBID) se relocalise à la mitochondrie pour se lier à Bak et faciliter ainsi son insertion dans la membrane mitochondriale, déclenchant l'activation des caspases effectrices via la voie intrinsèque (Wei et al., 2000).



**Figure 9 Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** La voie extrinsèque de l'apoptose est induite suite à l'activation des récepteurs de mort tels que Fas et TNFR1. La voie intrinsèque est celle induite par les agents génotoxiques et autres stress cellulaires. L'induction ou l'activation de protéines à BH3-seuls inactive les membres de la famille Bcl-2 ou active directement Bax et Bak. Dans les deux voies, l'inhibition de Bax et Bak est levée ce qui permet la libération du cytochrome c, la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases effectrices.

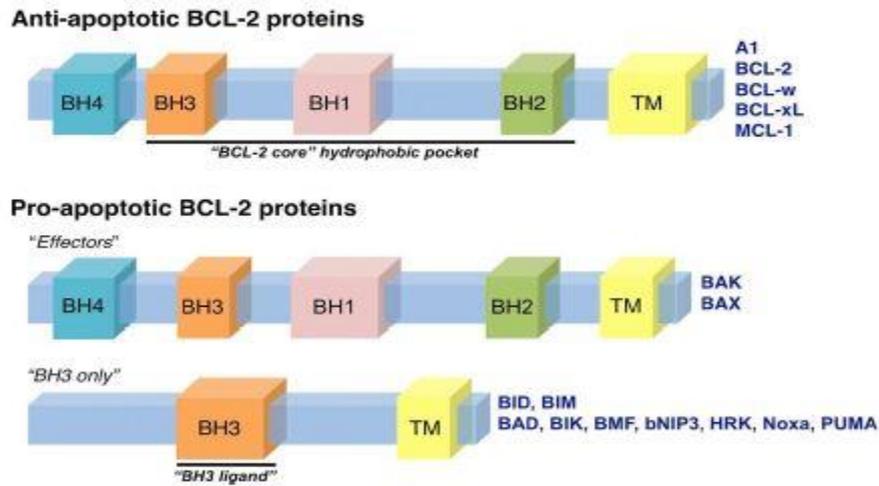
---

## 2 Voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale est déclenchée par des signaux lors du développement, des lésions cytotoxiques telles qu'une infection virale, des dommages de l'ADN ou une carence en facteur de croissance. Cette voie est dépendante de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP, mitochondria outer membrane permeabilization) qui est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2. La MOMP induit la libération de molécules apoptogéniques comme le cytochrome c et SMAC/DIABLO. La fixation du cytochrome c sur APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) induit un changement de conformation responsable de l'oligomérisation d'APAF-1. Le complexe ainsi formé recrute la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome. Au cœur de l'apoptosome la caspase-9 active les caspases-3, -6 ou -7 dites effectrices. En retour, les caspases effectrices clivent des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire, activent des endonucléases qui fractionnent l'ADN et orchestrent le démantèlement de la cellule (Youle and Strasser, 2008).

### 2.1 Activités opposées des membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 sont divisés en trois groupes selon les domaines d'homologie, ou domaines BH (Bcl-2 homology domains) qu'ils partagent (Figure 10). La première classe, qualifiée d'anti-apoptotique, inhibe l'apoptose, elle comprend Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-2L10 et Bcl-2A1. La seconde classe, ou pro-apoptotique, déclenche l'apoptose, elle concerne Bax, Bak et Bok. La troisième classe contient ce que l'on nomme les protéines à BH3-seul. Ces protéines ont la particularité d'avoir un domaine conservé BH3 qui leur permet de séquestrer les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques afin de promouvoir l'apoptose. Les protéines à BH3-seul sont divisées en deux sous-groupes, les activateurs directs (Bid, Bim et Puma) qui sont capables d'activer directement Bax et Bak et les sensibilisateurs ou dérépresseurs (Bad, Bik, Bmf, Hrk, Noxa et Puma) qui inhibent les protéines anti-apoptotiques et permettent la libération des activateurs directs Bax et Bak.

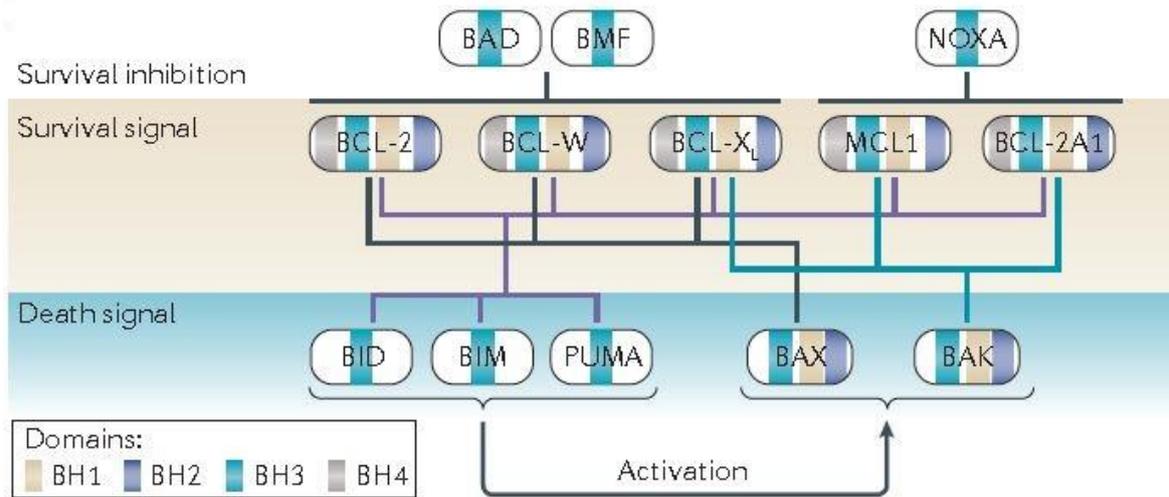


**Figure 10 Classification simplifiée des membres de la famille Bcl-2 (Anvekar et al., 2011)**

L'induction de l'apoptose repose sur des interactions sélectives entre des sous-groupes particuliers de protéines de la famille Bcl-2 (Figure 11) (Juin et al., 2013; Youle, 2007). Parmi les pro-apoptotiques, Bax et Bak sont les deux seuls effecteurs capables de provoquer la MOMP. Les anti-apoptotiques ont pour fonction d'inhiber Bax et Bak. Lors d'un stimulus apoptotique, les anti-apoptotiques sont régulés par les protéines à BH3-seul. Bim, Puma et tBid peuvent engager tous les membres anti-apoptotiques et sont donc de puissants inducteurs de l'apoptose. Les autres membres ne peuvent lier qu'une sélection de protéines anti-apoptotiques (Chen et al., 2005) :

- Bad et Bmf se lient à Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w,
- Bik et Hrk se lient à Bcl-xL, Bcl-w et Bcl-2A1,
- Noxa a une affinité particulière pour Mcl-1 mais peut aussi se lier à Bcl-2A1.

Suivant ce schéma, une coopération entre Bad et Noxa permet une inhibition totale des pro-apoptotiques (Figure 11).



**Figure 11 Interactions des protéines de la famille Bcl-2.** (Juin et al., 2013)

## 2.2 Modèles d'interaction des protéines de la famille Bcl-2

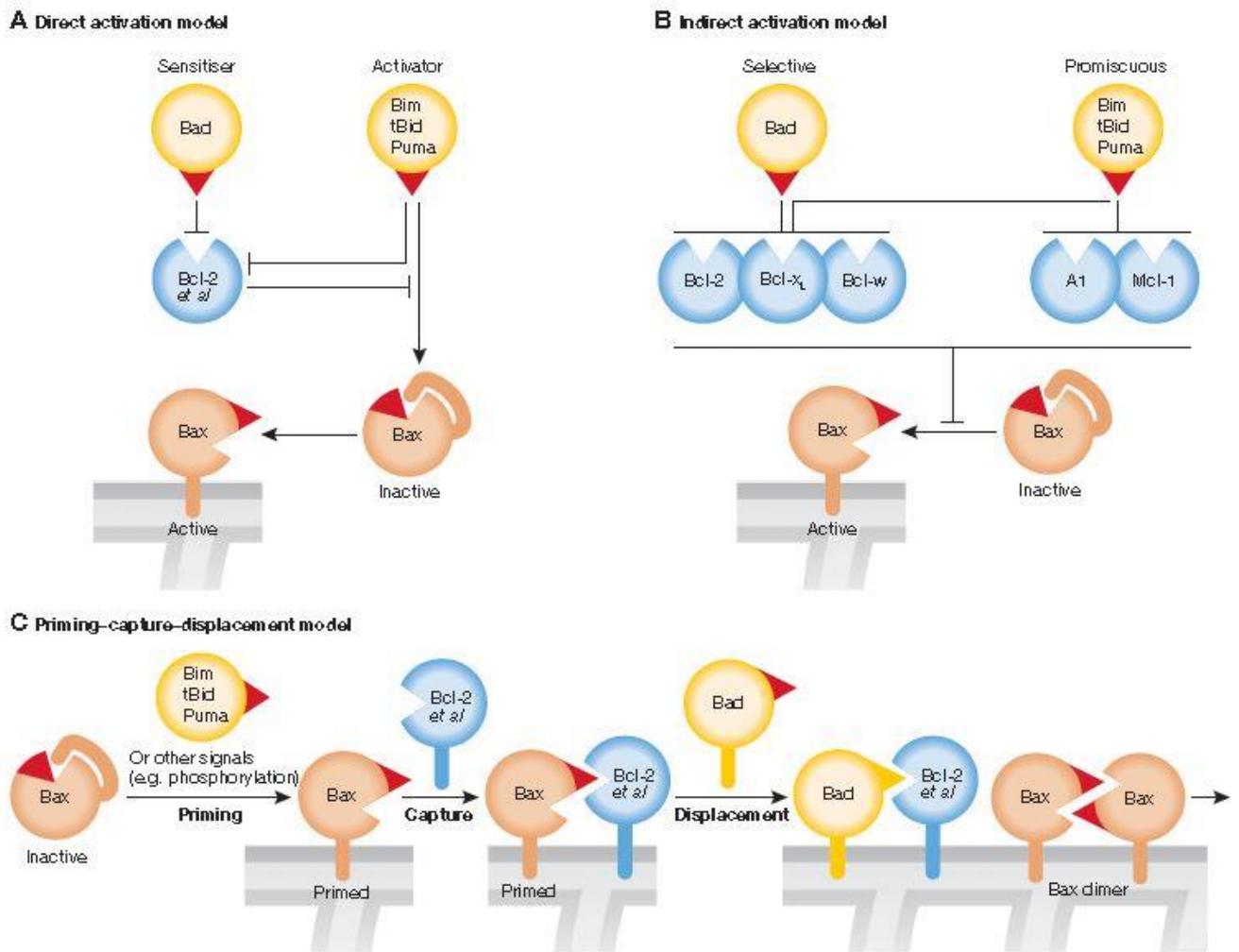
À ce jour deux modèles de régulation des protéines anti-apoptotiques sont proposés, les deux pouvant exister simultanément. Dans le modèle d'activation directe ou de dérèglement (Letai et al., 2002) (Figure 12a) les protéines de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques lient et séquestrent les BH3-seuls activateurs directs de Bax et Bak (dans l'exemple Bcl-2 séquestre Bim). En réponse aux stimuli apoptotiques, des protéines à BH3-seul dérèglement (ici Bad) sont induites et vont déplacer l'activateur direct et le libérer pour qu'il active Bax et Bak.

Dans le modèle d'activation indirecte ou de sensibilisation (Willis et al., 2007) (Figure 12b), on assume que Bax et Bak peuvent prendre une conformation active (peut-être spontanément) et que les protéines anti-apoptotiques les séquestrent lorsqu'ils exposent leur domaine BH3. Les protéines à BH3-seuls ont seulement besoin d'inactiver leurs protéines pro-apoptotiques relatives, et l'apoptose survient lorsque toutes les protéines anti-apoptotiques sont neutralisées.

Strasser *et al.* proposent une combinaison des deux modèles (Strasser et al., 2011). En effet, ils ont montré que l'inhibition de tous les membres de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques par Bim ne suffit pas à avoir une mort par apoptose optimale, il faut en plus que ce dernier soit capable d'interagir avec Bax (Mérino et al., 2009). Ils proposent ainsi le modèle d'amorçage-capture-déplacement (priming-capture-displacement) ou Bax et Bak sont activés

par des BH3-seuls (ou d'autres signaux) et que ces formes amorcées soient immédiatement capturées par les protéines anti-apoptotiques jusqu'à ce que des BH3-seuls les déplacent et libèrent donc Bax et Bak actifs (Figure 12c).

La régulation de Bax et Bak par les membres de la famille Bcl-2 reste donc encore controversée. Toutefois ces modèles montrent que lorsqu'un signal apoptotique est déclenché, l'induction de la MOMP dépend de la régulation des protéines à BH3-seul.



**Figure 12 Modèles de régulation de l'activation de Bax par les membres de la famille Bcl-2.**

### **2.3 Activation de Bax et de Bak**

Suite à un stress cellulaire induisant l'apoptose, la mort repose sur l'activation des deux effecteurs Bax et Bak dont l'oligomérisation à la membrane externe mitochondriale provoque la perméabilisation de celle-ci. Cette étape cruciale est pourtant encore largement incomprise.

Dans les cellules saines, Bax est largement cytosolique mais est dirigé vers la membrane mitochondriale externe en réponse à un stimulus apoptotique (Edlich et al., 2011; Wolter et al., 1997). Ce changement de compartiment peut être inhibé par une surexpression de Bcl-2 (Murphy et al., 2000). Bax est considéré comme ayant deux états conformationnels : le Bax natif, présent dans le cytosol (CLIC, cytosolic locked in conformation) et le Bax activé capable de perméabiliser la mitochondrie (CLAC, cytochrome c liberation associated conformation) Dans sa forme CLIC, la séquence d'adressage à la mitochondrie en N-terminal de Bax est cachée. Des protéines à BH3-seuls activatrices comme par exemple tBid perturbent la conformation de Bax et exposent cette séquence signal. Une fois à la mitochondrie Bax interagit avec des récepteurs de la membrane externe tels que TOM22. L'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale est liée à un changement de conformation qui révèle les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  et le domaine BH3. Bax va ensuite aboutir à sa forme CLAC active par son homo-oligomérisation et la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale (Lalier et al., 2007).

À l'inverse de Bax qui est sous forme de monomère dans le cytosol, Bak se trouve normalement à la mitochondrie où il est constitutivement lié à Mcl-1 ou Bcl-xL mais pas à Bcl-2 (Willis et al., 2005). Au déclenchement de l'apoptose, Mcl-1 est dégradé et/ou les interactions Mcl-1/Bak, Bcl-xL/Bak sont perturbées par des protéines à BH3-seuls comme Noxa, Bim ou Bik, ce qui permet la libération de Bak et son oligomérisation. Cependant des formes mutantes de Bak ne pouvant lier Mcl-1 et Bcl-xL n'induisent pas spontanément l'apoptose, ce qui indique que le retrait de l'inhibition de Bak par ces deux protéines n'est pas suffisant.

### **2.4 Activation des caspases**

Une fois l'apoptose déclenchée, le démantèlement cellulaire est orchestré par des protéases à cystéines, les caspases. Les caspases sont initialement traduites sous la forme de précurseurs zymogéniques inactifs ce qui est une première forme de régulation puisqu'elles ne

seront activées qu'en réponse à des stimuli de mort spécifiques (Earnshaw et al., 1999). Les caspases sont catégorisées en caspases initiatrices ou caspases effectrices suivant leur position dans la cascade de signalisation apoptotique. Les caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) agissent en amont des voies de mort et partagent une structure similaire dans leur long prodomaine. Elles sont activées lorsque des protéines adaptatrices interagissent avec leur prodomaine et induisent leur dimérisation (Pop and Salvesen, 2009). Au contraire les caspases effectrices (caspases-3, ont un prodomaine plus court et existent déjà sous la forme d'homodimères inactifs. Après clivage par les caspases initiatrices, les caspases effectrices agissent directement sur des substrats cellulaires spécifiques et démantèlent la cellule.

La caspase-9 est activée suite à la libération du cytochrome c par la mitochondrie et a donc un rôle crucial dans l'activation des caspases effectrices à ce point de la voie de signalisation. L'activité de la caspase-9 est donc hautement régulée notamment par phosphorylation (Allan and Clarke, 2007, 2009). La caspase-9 peut aussi être contrôlée au niveau protéique via ubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), un membre de la famille des IAPs (inhibitor of apoptosis protein) (Silke and Meier, 2013).

## **3 Régulation de l'expression des protéines de la famille Bcl-2**

### **3.1 Régulation des pro-apoptotiques**

Les protéines à BH3-seuls fonctionnent comme les senseurs initiaux des signaux apoptotiques. L'expression des BH3-seuls peut être induite par des facteurs de transcription. Par exemple Noxa et Puma sont induits par p53 en réponse aux dommages de l'ADN et Bim peut être induit par FOXO3A en réponse à la déprivation en nutriments (Dijkers et al., 2000; Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000). D'autres mécanismes post-traductionnels peuvent activer les BH3-seuls. Par exemple Bad est activé après une perte de phosphorylation en réponse à la déprivation en facteurs de croissance, BID est activé par la caspase-8, Bim est activé par la perte de sa phosphorylation par ERK qui dans des cellules saines le cible vers une ubiquitination et une dégradation protéosomale (Li et al., 1998; Puthalakath et al., 1999; Zha et al., 1996). Il est plus rare de voir une variation dans l'expression de Bax et Bak, ces

protéines semblent être exprimées à des niveaux plus ou moins constants. Bax et Bak sont principalement régulés post-transcriptionnellement par les autres membres de la famille Bcl-2.

### **3.2 Régulation des anti-apoptotiques : cas de Mcl-1**

La régulation du niveau d'expression des anti-apoptotiques est un autre moyen pour la cellule de réguler l'apoptose. Par exemple, la transcription de Bcl-xL peut être induite par des facteurs de croissance via la voie JAK-STAT. Mcl-1 est rapidement dégradé par la voie ubiquitine-protéasome en réponse à la déprivation en cytokines ou des stimuli de mort (Nijhawan et al., 2003). Il peut aussi être surexprimé de façon post-transcriptionnelle afin de prévenir l'apoptose.

Mcl-1 est une protéine plus grosse (350aa) que les autres membres anti-apoptotiques néanmoins elle contient trois domaines BH contrairement aux autres qui en ont quatre. Mcl-1 est aussi différente des autres protéines pro-survie par sa partie N-terminale qui est plus large que celle des autres membres et affecte ses fonctions et sa localisation qui peut être mitochondriale ou nucléaire. Mcl-1 séquestre directement Bak dans les cellules saines (Cuconati et al., 2003). Par ailleurs, Bak semble être le seul partenaire d'interaction de Mcl-1 dans les cellules saines comme le montre Verhagen (communication personnelle) par immunoprécipitation à grande échelle (Willis et al., 2005).

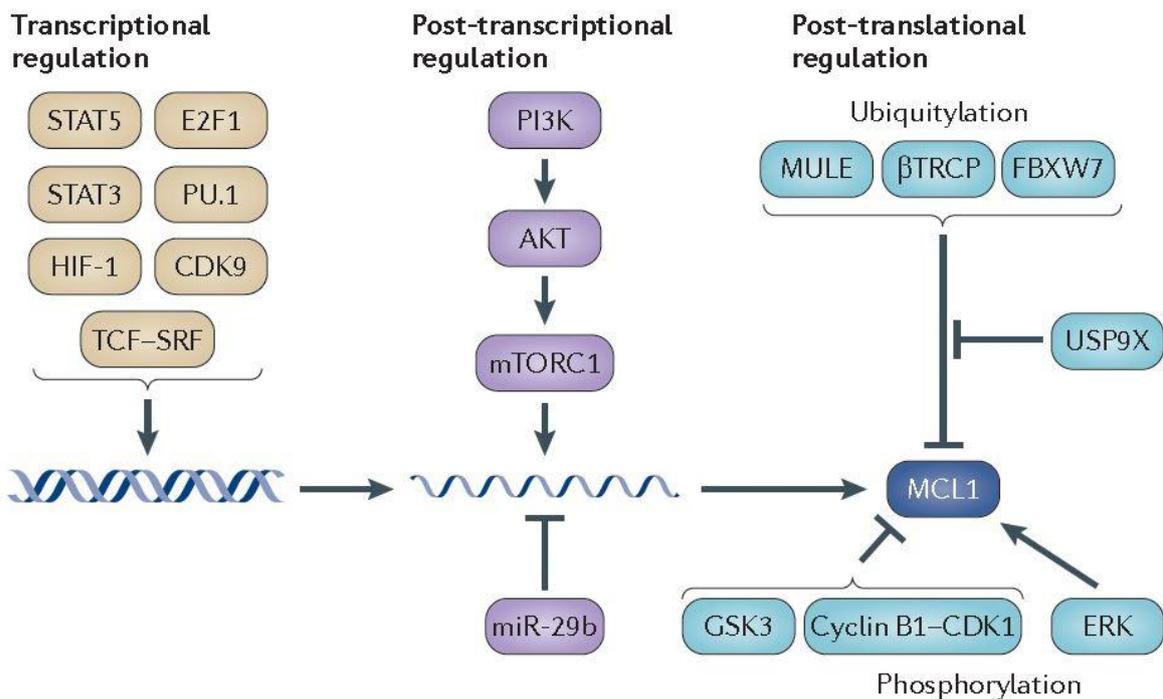
#### ***3.2.1 Régulation de l'expression***

Mcl-1 est finement régulé par de multiples mécanismes, qu'ils soient transcriptionnels, post-transcriptionnels ou post-traductionnels (Figure 13). Par exemple, une variété de cytokines et de voies de signalisation qui incluent PI3K/AKT, Stat-3 et p38/MAPK induisent la transcription du gène *MCL1* (Akgul, 2009). De plus, un épissage alternatif de Mcl-1 produit deux formes de la protéine, Mcl-1-L et Mcl-1-S. L'isoforme Mcl-1-S agit de manière opposée à l'isoforme complète et promeut l'apoptose à la façon d'une protéine à BH3-seul (Bingle et al., 2000). Au niveau de la traduction, plusieurs études ont montré l'implication de miR29b dans la régulation de Mcl-1 (Mott et al., 2007; Steele et al., 2010).

#### ***3.2.2 Régulation de la dégradation de Mcl-1 par le protéasome***

Mcl-1 est unique parmi les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 car elle a une demi-vie très courte, due à une régulation fine de sa dégradation par le protéasome. Deux

mécanismes régulent cette dégradation, la phosphorylation de la protéine et son ubiquitination. Mcl-1 contient de multiples sites de phosphorylation dans ses deux régions PEST (proline, acide glutamique, sérine, thréonine) connues pour diriger les protéines vers leur dégradation. La thréonine 163 peut être phosphorylée par ERK ce qui augmente la demi-vie de la protéine (Domina et al., 2004). À l'inverse, la phosphorylation de la sérine 159 par GSK3 augmente l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 (Maurer et al., 2006). Le principal médiateur de la dégradation physiologique de Mcl-1 est MULE/ARF-BP1 (Mcl-1 ubiquitin ligase E3), qui ubiquitine Mcl-1 sur cinq résidus différents (Zhong et al., 2005). À l'inverse la déubiquitinase USP9X stabilise Mcl-1 en enlevant les polyubiquitines liées à la lysine 48 et protège ainsi de l'apoptose (Schwickart et al., 2010). Noxa interagit directement avec Mcl-1 au niveau de la mitochondrie pour induire sa dégradation. En parallèle Noxa augmente les interactions MULE/Mcl-1 et diminue les interactions USP9X/Mcl-1 favorisant la dégradation de Mcl-1 par le protéasome (Gomez-Bougie et al., 2011).



**Figure 13 Acteurs de la régulation de Mcl-1.** (Juin et al., 2013)

## **4 Famille Bcl-2 et gliomes**

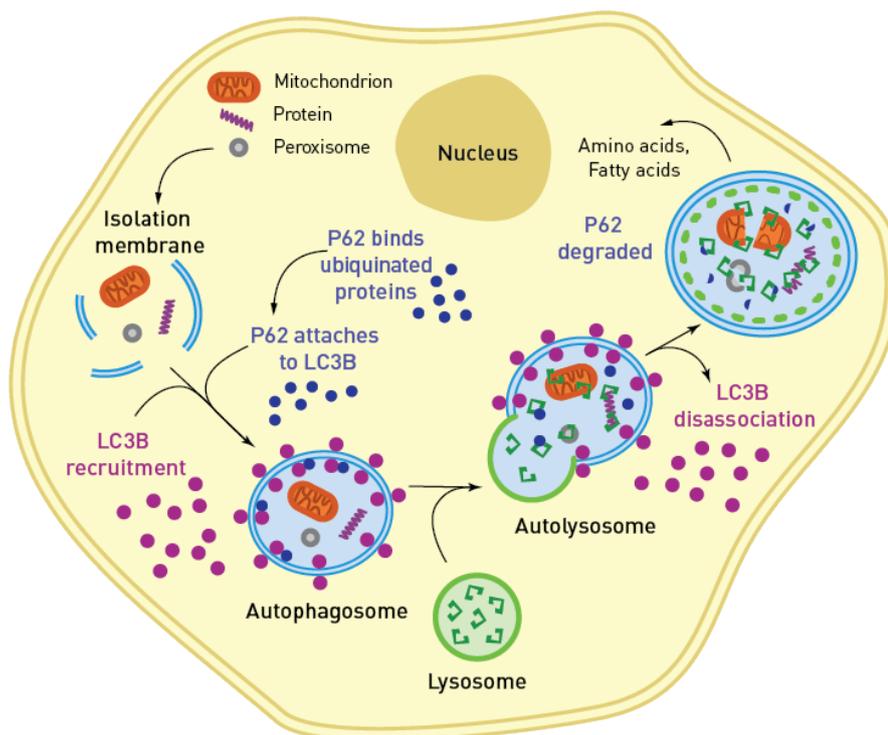
Paradoxalement on retrouve plus souvent une surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les gliomes de bas grade que dans les GBMs et cette surexpression est associée avec un pronostic plus favorable. De façon similaire, un haut niveau de Bax est retrouvé dans les gliomes de haut grade (Fels et al., 2000; McDonald et al., 2002). Une forme tronquée en N-terminal de Bax, appelée Baxpsi, est présente dans 24% des patients. Baxpsi est retrouvée préférentiellement à la mitochondrie et est associée à une meilleure survie dans les gliomes (Cartron et al., 2002). Plusieurs petites molécules inhibitrices ont été synthétisées par agir en tant que BH3-mimétique et prévenir l'association de Bcl-2 et Bcl-xL avec leurs protéines pro-apoptotiques associées. Parmi celle-ci, le HA-14-1 et l'ABT-737 qui possèdent une forte affinité pour Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w, induisent l'apoptose dans les lignées de gliomes en promouvant la libération de Bax (Bertin-Ciftci et al., 2013; Manero et al., 2006). La résistance à l'ABT-737 est principalement liée à une surexpression de Mcl-1 ce qui suggère qu'une double inhibition de Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w et de Mcl-1 est obligatoire pour une induction de l'apoptose substantielle (Tagscherer et al., 2008).

## **5 Interconnexion entre l'autophagie et l'apoptose dans la réponse au TMZ**

L'autophagie est un processus ubiquitaire à plusieurs étapes, conservé au cours de l'évolution. L'autophagie séquestre le matériel cytosolique (cytoplasme, protéines, organites cellulaires) dans une vacuole à double membrane et le délivre aux lysosomes pour être dégradé et recyclé (Nakatogawa et al., 2009). L'autophagie commence avec la formation d'une structure à double membrane appelée phagophore qui encapsule le matériel cytoplasmique et le scelle pour former l'autophagosome. L'autophagosome fusionne avec des lysosomes et génère des autophagolysosomes, là peut commencer la dégradation du matériel cytoplasmique. La protéine p62 connecte les agrégats protéiques à la machinerie autophagique en se liant d'un côté aux protéines ubiquitinées par son domaine ubiquitine et d'un autre côté à la protéine de la membrane autophagosomale LC3-II par son domaine LC3 (Yao, 2010) (Figure 14). Le recrutement des agrégats protéiques par p62 favorise donc leur

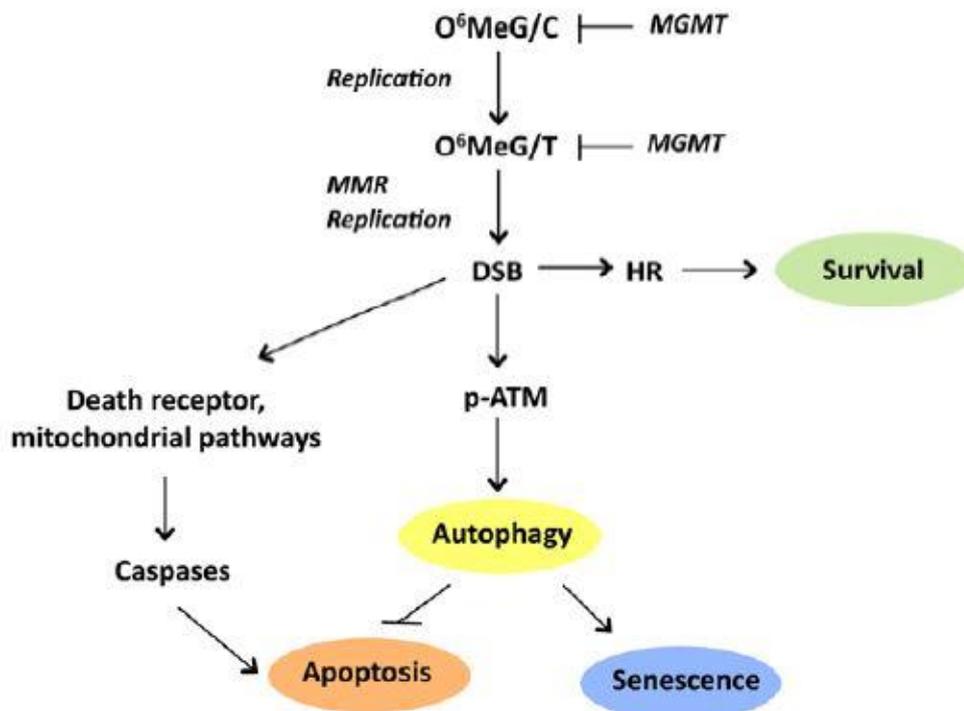
dégradation. De plus, p62 elle-même est un substrat de la dégradation autophagique et diminue lorsque celle-ci est activée.

L'autophagie, a un rôle plus complexe que la sénescence et l'apoptose en réponse aux traitements anticancéreux. Elle a donc une fonction de survie en réponse à une carence en nutriments, à l'absence de facteurs de croissances ou à l'hypoxie. Paradoxalement, l'accumulation de vacuoles autophagiques conduit à la mort autophagique ou mort programmée de type II (par opposition à l'apoptose ou mort programmée de type I) (Levine and Kroemer, 2008; Mathew et al., 2007a; White, 2012). Un défaut de l'autophagie augmente le stress cellulaire jusqu'à provoquer des dommages de l'ADN (par un mécanisme qui n'est pas encore compris) et une induction plus rapide de l'apoptose (Karantza-Wadsworth et al., 2007; Mathew et al., 2007b). L'autophagie a donc un rôle général de protection de la cellule face au stress.



**Figure 14 Processus d'autophagie.** Formation d'une vacuole qui s'allonge séquestre le contenu cytoplasmique et les protéines ubiquitinées liées à p62 pour former l'autophagosome après recrutement et clivage de LC3B. L'autophagosome fusionne avec un lysosome et les enzymes présentes dans le lysosome vont dégrader le contenu de l'autophagosome.

Plusieurs groupes proposent une relation séquentielle entre l'autophagie, l'apoptose et la sénescence en réponse au TMZ (Figure 15). (Kanzawa et al., 2004; Knizhnik et al., 2013). L'autophagie semble être dépendante des lésions O<sup>6</sup>-MeG puisqu'elles peuvent être abrogées par l'expression de MGMT. Des cellules déficientes pour ATM ou avec un MMR défectif ne peuvent induire d'autophagie en réponse au TMZ ce qui suggère un rôle important de la signalisation des dommages de l'ADN dans la voie décisionnelle de survie ou de mort. En revanche, les mécanismes moléculaires de déclenchement de l'apoptose par le TMZ ne sont pas documentés dans la littérature.



**Figure 15** Modèle de réponse au TMZ.

Les données prouvant une interconnexion entre l'autophagie et l'apoptose sont récentes. Par exemple, la protéine autophagique Beclin-1 (requisse pour l'initiation de la formation de l'autophagosome) est inhibée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 via une liaison directe de leurs domaines BH3 (Maiuri et al., 2007; Pattingre et al.,

2005). Plus récemment, la protéine pro-apoptotique BIM a aussi été identifiée comme partenaire de Beclin-1 et inhibe la formation des autophagosomes en recrutant Beclin-1 aux microtubules (Luo et al., 2012). De même l'effet inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-xL sur Beclin-1 dépend de leur localisation subcellulaire au réticulum endoplasmique et non à la mitochondrie (Pattingre et al., 2005). Ces résultats suggèrent donc une organisation spatiale dans le contrôle de l'autophagie et de l'apoptose par les membres de la famille Bcl-2.

## D. L'EGFR ET SES LIGANDS DANS LA RESISTANCE AU TRAITEMENT

L'amplification, la surexpression et la mutation d'EGFR sont des phénomènes fréquents dans la plupart des cancers humains incluant les cancers du sein, les cancers non à petites cellules du poumon, les cancers de la vessie et les cancers du cerveau et du cou (Casalini et al., 2004). Les anomalies de l'EGFR sont associées avec des fonctions clés du développement et de la croissance des cancers, c'est-à-dire la prolifération autonome des cellules, l'invasion, l'angiogenèse et le potentiel métastatique (Herbst, 2004).

L'EGFR joue un rôle critique dans la biologie des GBMs, il est un contributeur primaire de leur initiation et de leur progression. L'amplification d'*EGFR* est une anomalie fréquente dans les GBMs primaires qui survient dans 35 à 45% des tumeurs (Loew et al., 2009). L'augmentation du niveau d'EGFR dans les GBMs peut être due à une amplification, une surexpression ou les deux. Tous les GBMs primaires présentant une amplification d'*EGFR* montrent une surexpression, tandis que 70-80% de ceux présentant la surexpression ont une amplification du gène ce qui montre qu'une partie des tumeurs ont une augmentation d'EGFR en absence de l'amplification du gène (Ohgaki and Kleihues, 2009).

La surexpression d'EGFR est associée, indépendamment de la MGMT, à un mauvais pronostic dans les GBMs traités par TMZ et radiothérapie (Murat et al., 2008). Des polymorphismes contenus dans les gènes de l'EGFR et de l'EGF pourraient être associés à un facteur de risque pronostic (Sjöström et al., 2010). Les patients surexprimant EGFR pourraient donc potentiellement bénéficier de thérapies additionnelles spécifiques.

Ainsi après un rappel sur la famille de l'EGFR, les résultats cliniques de l'utilisation des inhibiteurs d'EGFR dans le GBM seront présentés.

### 1 La famille de récepteur à tyrosine kinase HER

L'EGFR (epidermal growth factor receptor) fait partie de la plus grande famille de récepteurs connue, la super-famille des récepteurs à tyrosine kinase (RTK). Ces récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase qui leur permet de phosphoryler des tyrosines de leur propre chaîne

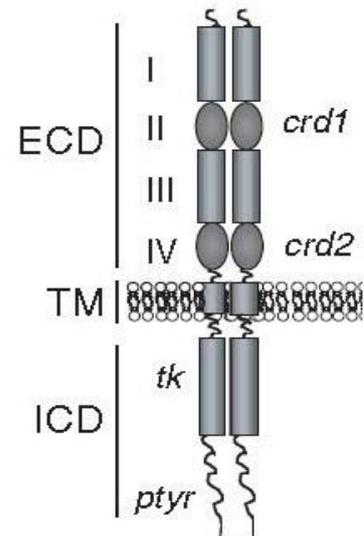
polypeptidique mais aussi des tyrosines d'autres substrats et constitue le point d'initiation de l'activation de voies de signalisation intracellulaire. Les RTKs régissent la communication entre les signaux extracellulaires, provenant des facteurs de croissance, et les signaux intracellulaires (Schlessinger, 2000). Ces récepteurs sont exprimés dans la quasi-totalité des tissus non hématopoïétiques où ils jouent un rôle central dans la prolifération et la différenciation cellulaire, notamment au cours du développement (Olayioye et al., 2000). Une régulation fine des voies de signalisation est nécessaire à une croissance normale de la cellule. De ce fait les aberrations de la transduction du signal provoquent le développement d'un phénotype tumoral, caractérisé par des altérations dans la différenciation, une survie et une prolifération accrues, une résistance aux signaux apoptotiques, une angiogenèse active et un caractère invasif (Casalini et al., 2004; Normanno et al., 2006; Olayioye et al., 2000).

## 1.1 Composition et structure

EGFR appartient à un sous-groupe de RTK appelé famille HER qui contient quatre membres :

- HER1 ou ErbB1 ou EGFR ;
- HER2 ou ErbB2 ou neu ;
- HER3 ou ErbB3 ;
- HER4 ou ErbB4.

Les quatre récepteurs de la famille HER partagent une structure identique composée d'un domaine extracellulaire de liaison (ECD), d'un domaine transmembranaire (TM) et d'un long domaine intracytoplasmique (ICD) qui comporte une activité tyrosine kinase (tk) et des phospho-tyrosines (ptyr) (Figure 16) (Sliwkowski, 2003). Le domaine extracellulaire contient quatre sous-domaines arrangés en tandem. Le premier et le troisième sous-domaine (I et III) ont une conformation en tonneau- $\beta$  et les domaines II et IV sont les domaines riches en cystéines.

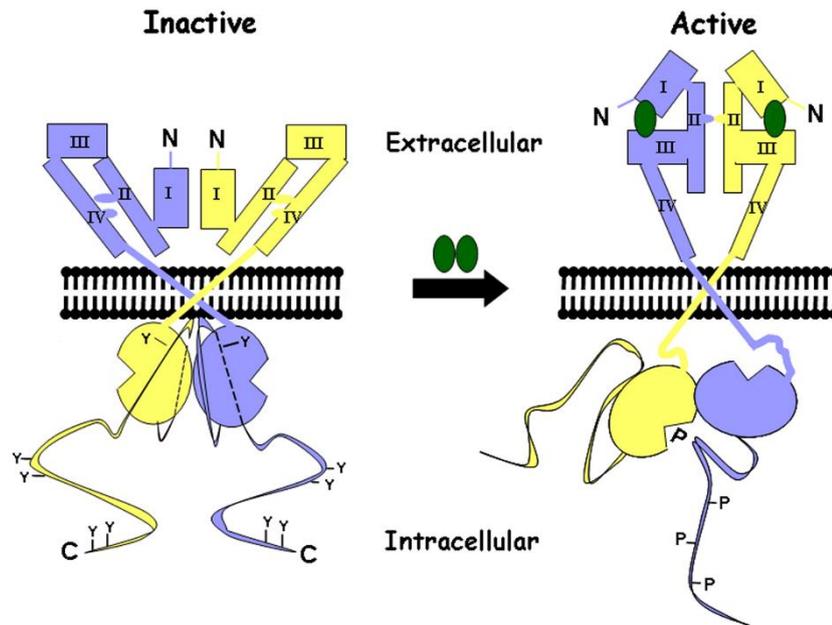


**Figure 16 Structure récepteur HER.**  
(Sliwkowski, 2003)

## 1.2 Activation du récepteur

Chaque récepteur possède un domaine permettant la dimérisation et un domaine de fixation du ligand. La partie intracellulaire des récepteurs HER contient des domaines tyrosine kinases hautement conservés. Seul HER3 ne possède pas d'activité kinase (Hsieh and Moasser, 2007). EGFR, HER3 et HER4 peuvent naturellement former des homo- ou hétérodimères. Les dimères ne sont capables d'induire le signal qu'après stabilisation suite à la fixation du ligand. Les ligands de la famille HER sont de type monomériques c'est-à-dire qu'ils induisent des complexes avec une stœchiométrie ligand/récepteur de 2:2 (Tzahar et al., 1997).

L'étude de la structure d'EGFR par cristallographie a révélé qu'il existe sous deux conformations distinctes (Ogiso et al., 2002). La conformation fermée est inactive car les domaines II et IV sont attachés entre eux et empêchent les domaines I et III de se rassembler pour former le site de liaison au ligand (Figure 17). Cette conformation est en équilibre avec une conformation ouverte active du récepteur où les domaines II et IV s'éloignent des domaines I et III ce qui d'une part forme la poche de liaison au ligand et d'autre part expose la boucle du domaine II nécessaire à la dimérisation du récepteur. En l'absence de ligand, l'équilibre se déplace vers la conformation fermée. La liaison du ligand stabilise la conformation ouverte ce qui permet l'accumulation de dimères actifs, l'autophosphorylation en trans du récepteur et le début de la signalisation.



**Figure 17 Mécanisme de fixation du ligand et de dimérisation d'EGFR.** (Landau et al., 2004)

Contrairement aux autres membres HER2 n'a pas besoin de ligand car il est constitutivement sous une forme active (Cho et al., 2003). Il ne peut d'ailleurs pas s'homodimériser mais sa forte activité kinase permet de potentialiser l'activation des autres membres de la famille HER (Tzahar et al., 1996). HER2 est par exemple capable de moduler finement les zones de phosphorylation d'EGFR (Hartman et al., 2012). Ainsi il va retarder l'endocytose et la dégradation d'EGFR ce qui prolonge la durée du signal.

### 1.3 Ligands des récepteurs HER

La partie extracellulaire est la moins conservée parmi les récepteurs, ce qui la rend responsable des différences d'affinités envers les ligands. Les ligands de la famille HER sont généralement divisés en quatre groupes en fonction de leurs capacités de liaison aux différents récepteurs (Tableau 1) (Bianco 2007).

- Les ligands liant EGFR seulement;
- Les ligands liant EGFR et HER4 ;
- Les ligands liant HER3 et HER4 ;
- Les ligands liant HER4 seulement.

EGFR	HER2	HER3	HER4
Epidermal Growth Factor (EGF)		Neuréguline 1 (NRG1)	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HBEGF)
Transforming Growth Factor $\alpha$ (TGF $\alpha$ )		Neuréguline 2 (NRG2)	Bétacelluline (BTC)
Amphiréguline (AR)			Epiréguline (ER)
Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HBEGF)			Neuréguline 1 (NRG1)
Bétacelluline (BTC)			Neuréguline 2 (NRG2)
Epiréguline (ER)			Neuréguline 3 (NRG3)
			Neuréguline 4 (NRG4)

**Tableau 1 Famille HER et ses ligands.**

Chaque ligand possède une structure caractéristique appelée motif EGF. Il s'agit de trois domaines boucles créés par des ponts disulfures qui sont indispensables pour la liaison au récepteur. Les interactions de haute affinité pour les récepteurs sont donc médiées par ce motif EGF-like et induisent l'autophosphorylation du récepteur et l'initiation des voies de signalisation en cascade. Les autres structures retrouvées sont des domaines Ig-like, des sites de liaison à l'héparine et des sites de glycosylation (pour revue : Harris et al., 2003). La plupart des ligands proviennent d'un précurseur transmembranaire qui est biologiquement actif et peut donc interagir de manière juxtacrine. Les ligands solubles sont obtenus par clivage de ce précurseur. Ce clivage peut nécessiter l'intervention de métalloprotéases qui sont généralement exprimées par la cellule où se trouve le ligand (activation autocrine) mais aussi par les cellules voisines (activation paracrine), exception faite de l'EGF qui se retrouve dans la plupart des fluides biologiques (activation endocrine). Chaque ligand démontre un panel d'expression distinct selon le tissu et l'étape de développement de l'organisme.

Il est aussi important de noter que l'EGFR est capable de se lier à d'autres récepteurs à tyrosine kinase exprimés à la surface de la cellule tels que l'IGFR (insulin growth factor receptor), le PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) et le récepteur Fas (Eberle et al., 2005; Morgillo et al., 2006; Saito et al., 2001).

## **1.4 Voies de signalisations activées par EGFR**

À cause de sa complexité inhérente, les voies de signalisation des récepteurs de la famille HER sont souvent décrites de manière simplifiée comme un nœud papillon (bow-tie configuration) ou à partir d'un nombre important de signaux finement modulés (par 12 ligands et 4 récepteurs) on active une multitude de réponses cellulaires via un nombre limité d'effecteurs (Citri and Yarden, 2006). Ces signaux s'entrecroisent dans un réseau interconnecté qui agit sur la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse, la migration et l'invasion. Ci-après sont décrits les signaux régulés en particulier par l'EGFR (Figure 18).

### **1.4.1 *Ras/Raf/MAPK***

La voie des Ras/Ras/MAPK est une voie majeure de la signalisation de la famille HER. Le complexe de protéines adaptatrices GRB2/Sos se lie via une autre protéine adaptatrice Shc à des sites d'amarrage (docking site) intracellulaires spécifiques d'EGFR, après la phosphorylation des tyrosines kinases du récepteur (Batzer et al., 1994). Cette interaction change la conformation tridimensionnelle de Sos qui recrute et active Ras qui lui-même active RAF1, MAPK1 et MAPK2. Une fois activées les MAPKs phosphorylent et régulent des facteurs de transcription nucléaires qui induisent la migration et la prolifération cellulaire (Liebmann, 2001).

### **1.4.2 *PI3K/Akt***

La voie de signalisation PI3K régule la croissance, la résistance à l'apoptose mais aussi l'invasion et la migration. L'activation de PI3K intervient via la dimérisation d'EGFR avec HER3 qui possède des sites d'amarrage pour PI3K contrairement à EGFR (Soltoff et Cantley, 1996; Yarden et Sliwkowski, 2001). PI3K est composé de deux sous-unités enzymatiques, p85 et p110. La sous-unité régulatrice p85 est directement associée au récepteur via l'interaction de son domaine SH2 (Src homology domain) avec les résidus phosphotyrosines. La sous-unité catalytique p110 phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-

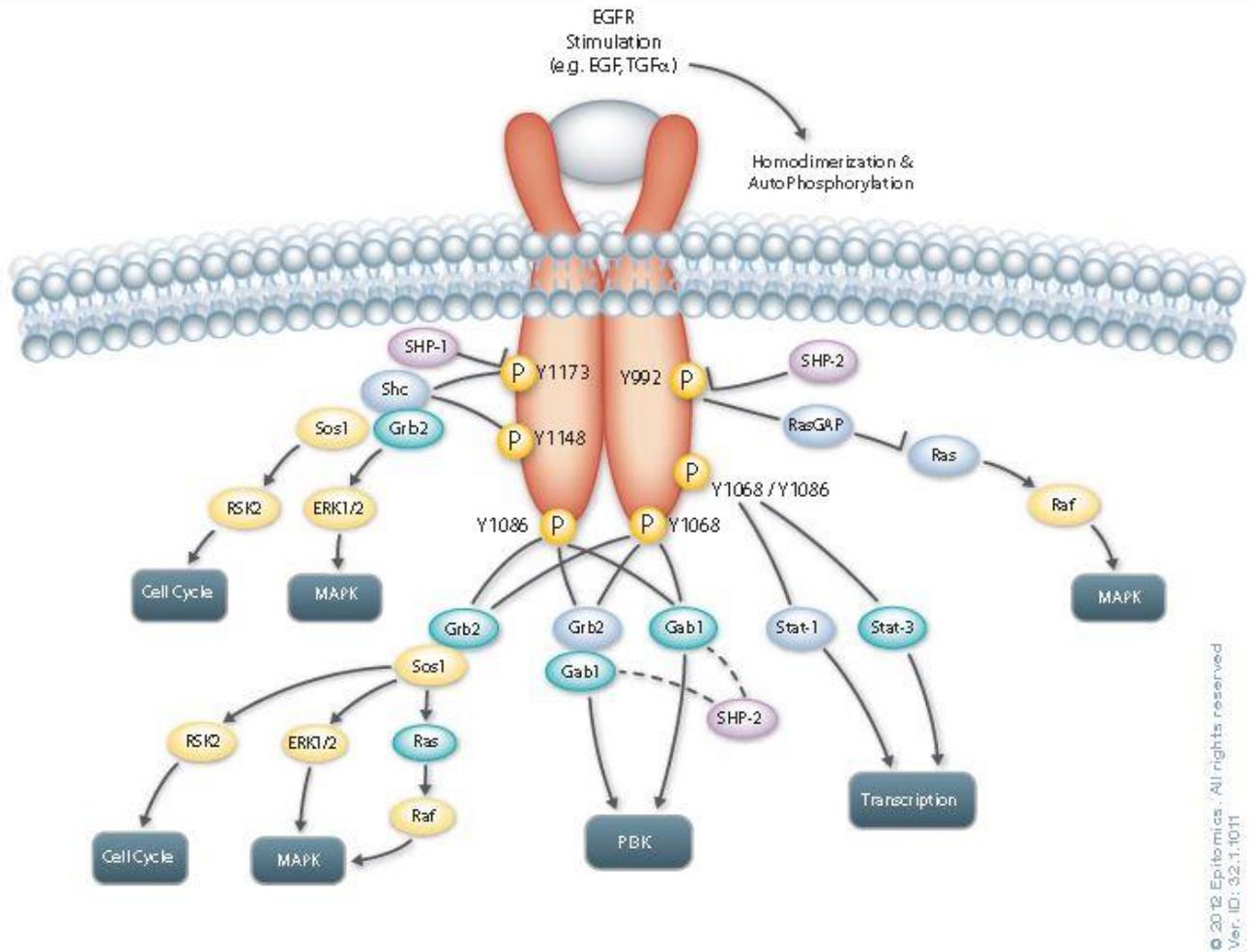
diphosphate en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate qui en retour phosphoryle et active la sérine/thréonine kinase Akt (Vivanco et Sawyers, 2002).

### **1.4.3 Famille STAT**

EGFR peut réguler la voie STAT de façon dépendante ou indépendante de JAK (Janus Kinase). Les protéines STATs sont une famille de facteurs de transcription cytoplasmiques qui existent sous forme de monomères inactifs. Les protéines STATs interagissent via leur domaine SH2 avec les résidus phosphotyrosines et après dimérisation se localisent au noyau où elles induisent l'expression de gènes cibles. De nombreuses études ont montré l'activation constitutive de STAT-3 et STAT-5 dans différentes tumeurs.

### **1.4.4 Protéine kinase Src**

La protéine Src est une kinase cytoplasmique ne faisant pas partie des RTKs, elle joue un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération, de la migration, de l'adhésion, et de l'angiogenèse tumorale. La voie Src est interconnectée avec les voies de signalisation majeures comme PI3K et STAT. L'activité tyrosine kinase de Src est indépendante de la signalisation des RTKs mais elle peut interagir avec EGFR et augmenter sa signalisation. Src peut aussi être impliqué dans la résistance aux thérapies ciblant EGFR.



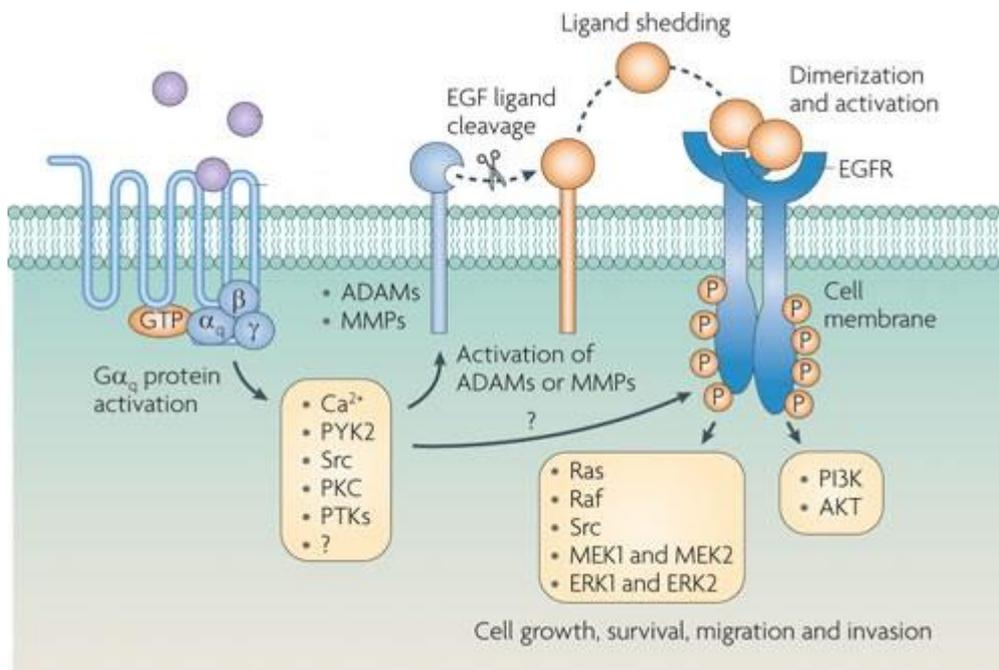
**Figure 18 Voies de signalisation de l'EGFR.**  
 (<http://www.epitomics.com/products/pathways/EGFR.php>)

## 1.5 Transactivation d'EGFR

Tous les ligands de la famille de l'EGF sont des protéines transmembranaires qui peuvent être clivées par des protéases à la surface de la cellule. Ce clivage, ou suppression de l'ectodomaine (ectodomain shedding) est une étape cruciale dans le contrôle de la disponibilité des ligands et de l'activation du récepteur. Ce processus appelé transactivation d'EGFR, a des implications biologiques importantes dans les cellules normales et cancéreuses (Figure 19) (Gschwind et al., 2001).

La transactivation d'EGFR a été décrite en premier lieu après l'activation de récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) (Daub et al., 1996). La transactivation d'EGFR a été démontrée avec de nombreux GPCRs et dans des modèles variés dont des cancers

humains. Cette transactivation induit la synthèse de l'ADN, la progression dans le cycle, ou bien encore la migration des cellules cancéreuses, ce qui suggère un rôle important dans la tumorigenèse (Fischer et al., 2003). Le proHBEGF (proforme du HBEGF) s'est alors révélé être un ligand crucial dans la transactivation d'EGFR en réponse à de nombreux stimuli tels que l'ester de phorbol TPA, l'ionophore de calcium mais aussi de nombreux facteurs de croissance et cytokines (Higashiyama et Nanba, 2005). La protéine kinase C (PKC) et MAPK sont impliqués dans le clivage du proHBEGF suite à l'activation des GPCRs. La plupart des protéases impliquées dans le clivage de l'ectodomaine sont des métalloprotéases de la famille des ADAMs (a desintegrase and metalloprotease) et plusieurs membres de cette famille sont associés avec de nombreux types de cancers (Mochizuki and Okada, 2007).



**Figure 19 Transactivation d'EGFR** (George et al., 2010)

## 1.6 EGFR dans la résistance au traitement

### 1.6.1 Localisation au noyau

Au-delà des voies de signalisation traditionnelles, EGFR peut être transporté de la membrane cellulaire au noyau et y exercer des fonctions biologiques. Il existe des séquences de localisation nucléaire (NLS) au cœur de tous les membres de la famille EGFR. EGFR

possède un NLS en trois parties contrairement aux autres membres où il est en une ou deux parties (Hsu et Hung, 2007). Le NLS et l'importine- $\beta$  sont impliquées dans la translocation nucléaire de l'EGFR et d'ErbB2. L'importine- $\beta$  forme un complexe avec les molécules ayant un NLS et peut se lier aux nucléoporines des complexes de pores nucléaires (Lo et al., 2006). De plus, l'endocytose du récepteur et son association avec des marqueurs endosomaux précoces sont requis pour l'import vers le noyau d'EGFR et ErbB2 (Giri et al., 2005).

La translocation de la forme totale d'EGFR au noyau est impliquée dans la régulation de la transcription, la prolifération cellulaire, la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN et la résistance à la chimio- radiothérapie. Le transport d'EGFR au noyau est associé à des mécanismes liés aux ligands et à l'apparition des dommages à l'ADN (Wang et al., 2010). D'un point de vue clinique, l'EGFR nucléaire est associé avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein, les cancers ovariens, et les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage (Hoshino et al., 2007; Lo et al., 2005; Xia et al., 2009).

L'EGFR nucléaire contribue à la résistance à la thérapie comme l'irradiation, le cisplatine et les rayons ionisants (Dittmann et al., 2008; Liccardi et al., 2011). En effet l'EGFR nucléaire est capable d'interagir directement avec DNA-PK et favorise ainsi la réparation de l'ADN (Dittmann et al., 2005). La signalisation classique d'EGFR notamment via les MAPK est aussi capable de réguler la réparation par recombinaison homologue (Kriegs et al., 2010). De manière similaire à la radiothérapie et la chimiothérapie, des modèles *in vitro* montrent que les cellules résistantes aux inhibiteurs d'EGFR gefitinib et cetuximab présentent un haut niveau d'EGFR nucléaire (Huang et al., 2011; Li et al., 2009). Ces études prouvent l'implication de la forme nucléaire d'EGFR dans la résistance aux inhibiteurs du récepteur.

Hormis la réparation et la résistance d'autres fonctions de l'EGFR nucléaire ont été décrites. Le variant auto-activé d'EGFR, EGFRvIII, a été détecté dans le noyau des cellules gliales normales et dans les GBMs primaires où il forme un complexe oncogénique avec Stat-3 et médie la transformation gliale (de la Iglesia et al., 2008). Plus récemment il a été montré que le complexe EGFRvIII/Stat-5b promeut l'oncogenèse et la résistance au traitement dans le glioblastome en régulant l'expression de Bcl-xL (Latha et al., 2013). Une autre étude montre que les complexes nucléaires EGFR/Stat-3 et EGFRvIII/Stat-3 peuvent activer l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les cellules de GBMs (Lo et al., 2010). Récemment un variant d'EGFR auquel il manque plusieurs domaines appelé mLEEK a été identifié comme facteur de transcription (Piccione et al., 2012).

### **1.6.2 Localisation à la mitochondrie**

Suite à la fixation de l'EGF, la forme totale de l'EGFR peut s'ancrer à la mitochondrie où elle s'associe avec la sous-unité II de la cytochrome c oxydase, un composant clé de la cascade de phosphorylation oxydative régulant l'apoptose via le relargage du cytochrome c de la mitochondrie (Demory et al., 2009). L'endocytose clathrine-dépendante, l'activité de la kinase c-Src et un signal de localisation mitochondriale dans le domaine juxtamembranaire d'EGFR sont aussi impliqués dans cette translocation à la mitochondrie. Le cetuximab induit une accumulation d'EGFRvIII à la mitochondrie ce qui suggère que ce changement de compartiment joue un rôle dans la réponse thérapeutique aux inhibiteurs d'EGFR (Dreier et al., 2012). Un récent papier montre qu'EGFR et son variant EGFRvIII peuvent subir une translocation à la mitochondrie après un traitement induisant l'apoptose ou l'inhibition d'EGFR par un TKI dans le GBM (Cao et al., 2011). Ainsi une forte présence d'EGFRvIII à la mitochondrie est associée à la résistance à la chimiothérapie et aux inhibiteurs d'EGFR. Cependant on ne sait toujours pas comment EGFR est transporté à la mitochondrie. D'autres études sont nécessaires pour savoir si EGFR est intégré à la membrane mitochondriale via une fusion avec la membrane endosomale ou bien s'il s'agit d'un autre mécanisme.

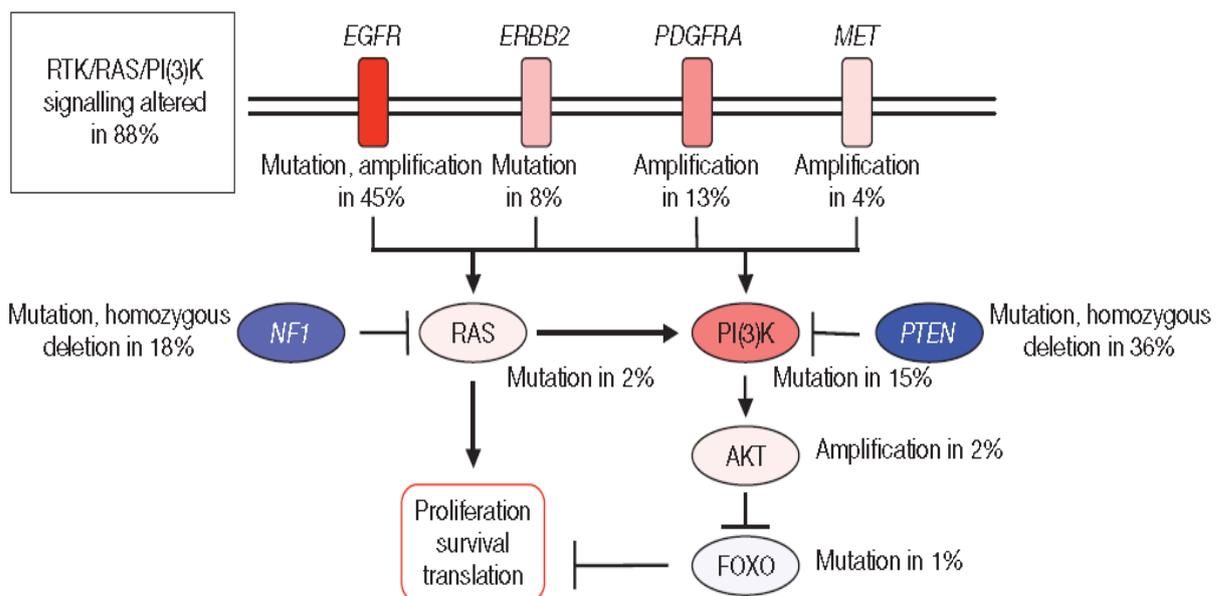
## **2 EGFR dans le GBM**

### **2.1 Dérégulation d'EGFR et de ses voies de signalisation dans les GBMs**

EGFR est le quatrième gène le plus muté dans les GBMs (TCGARN, 2008). Les mutations d'EGFR incluent des délétions et des mutations ponctuelles dans le domaine extracellulaire de liaison au ligand et des délétions dans la partie cytoplasmique. Un certain nombre de délétions du domaine extracellulaire sont exclusivement retrouvées dans les GBMs, elles incluent les variants EGFRvI et EGFRvII (12-16%) qui sont des protéines tronquées dont on pense qu'elles sont oncogéniques. Il en est de même pour les mutants EGFRvIV et vV (11-17%) qui sont délétés dans la partie cytoplasmique. Les mutations ponctuelles sont le plus souvent localisées à l'interface entre deux domaines d'EGFR. On pense qu'elles préviennent le rassemblement des domaines II et IV et favorisent la conformation active du récepteur.

La forme la plus courante et la mieux étudiée des mutations d'EGFR dans les GBMs est le variant EGFRvIII (55-62%). Il est aussi retrouvé dans les cancers du poumon non à petites cellules, du sein et de la prostate mais à une fréquence moindre que dans les GBMs. Environ 50 à 60% des GBMs surexprimant l'EGFR ont cette mutation (Ohgaki and Kleihues, 2009). La surexpression et l'amplification d'EGFRvIII et d'EGFR sont corrélés avec un pronostic plus sombre dans les GBMs (Shinojima et al., 2003). Récemment il a été montré qu'EGFR et EGFRvIII peuvent coopérer dans le GBM et augmenter spécifiquement l'activation de STAT-3 et -5 et non des voies PI3K et MAPK (Fan et al., 2013). EGFRvIII ne peut pas lier les ligands mais est constitutivement actif, induit une surexpression du HBEGF et engendre une boucle autocrine d'activation d'EGFR (Li et al., 2013).

La signalisation anormale de l'EGFR peut être due à plusieurs mécanismes qui incluent la surexpression du récepteur (fréquente dans les cancers humains), la mutation mais aussi des mécanismes due aux ligands. Le potentiel oncogénique d'EGFR et des RTKs dépend d'une activation accrue des voies de signalisation PI3K et MAPK. La voie Ras/Raf/MAPK joue un rôle important dans la transduction du signal mitotique et la prolifération tandis que la voie PI3K/AKT/mTOR joue un rôle dans l'inhibition de l'apoptose. En tout ce sont 88% des GBMs qui présentent au moins une mutation dans la voie des RTK/PI3K/MAPK (Figure 20) (TCGARN, 2008).

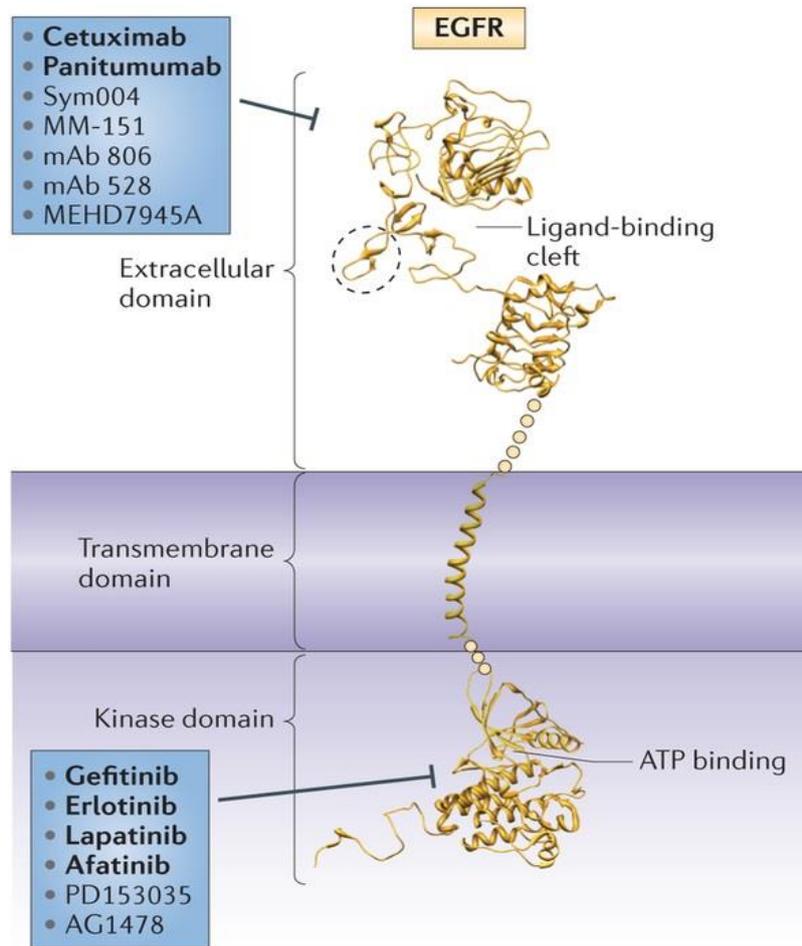


**Figure 20** Altérations génétiques de la voie RTK/RAS/PI3K dans les glioblastomes. (TCGARN, 2008)

## **2.2 Espoirs et échecs de la thérapie ciblée contre EGFR dans le GBM**

Au vu de la fréquente amplification et surexpression de l'EGFR dans les GBMs primaires, plusieurs inhibiteurs, utilisés dans le traitement d'autres cancers, ont été testés dans le traitement des GBMs (Figure 21). L'inhibition de l'EGFR dans les tumeurs peut être réalisé en ciblant le domaine tyrosine kinase, les voies de signalisation, la dimérisation du récepteur, le domaine de fixation du ligand ou directement des ligands spécifiques.

Les thérapies ciblées contre les tyrosine kinases, les voies de signalisation et les anticorps dirigés contre le récepteur sont les plus employées tandis que les thérapies visant des ligands spécifiques sont inexistantes. Dans le cas des GBMs, les petites molécules inhibitrices des tyrosine kinases (TKI) que sont l'erlotinib et le gefitinib ainsi que l'anticorps monoclonal cetuximab, ont montré des résultats prometteurs en études précliniques mais n'ont montré aucun effet significatif en monothérapie ou en combinaison avec le protocole standard (Brown et al., 2008; Franceschi et al., 2007; Neyns et al., 2009).



**Figure 21 Inhibiteurs ciblant l'EGFR utilisés en clinique.**

Les anticorps monoclonaux dirigés contre EGFR ont été introduit depuis les années 80 avec des anticorps de souris en première génération puis leurs versions humanisées. Cependant une étude prospective de phase I/II sur des patients avec des GBMs récurrents a montré que ces anticorps n'avaient aucune efficacité thérapeutique (Stragliotto et al., 1996). L'administration intracrânienne des anticorps demeurent impossible du fait d'une importante réaction inflammatoire (Wersäll et al., 1997). Cependant les espoirs des dernières années viennent de l'introduction de petites molécules inhibitrices les TKI.

Le gefitinib (ZD1839, Iressa<sup>®</sup>) est un inhibiteur réversible de l'activité tyrosine kinase d'EGFR qui n'induit pas l'internalisation ou la dégradation du récepteur et ne réduit pas son niveau protéique. Le gefitinib est retrouvé en grande quantité au sein de la zone tumorale et déphosphoryle efficacement l'EGFR (Hegi et al., 2011). Malgré la déphosphorylation

d'EGFR par le gefitinib, il n'apparaît pas de modulation évidente des voies de signalisation sous-jacentes, notamment ERK1/2 au récepteur *in vivo*.

L'erlotinib (OSI-774, Tarceva<sup>®</sup>) est aussi un TKI réversible. En plus de la forme sauvage, il est aussi capable d'inhiber la forme mutée EGFRvIII mais comme le gefitinib il n'a aucun effet sur la dégradation ou le niveau protéique d'EGFR. Contrairement au gefitinib, l'erlotinib est retrouvé à des concentrations plasmatiques faibles ce qui peut expliquer une déphosphorylation inefficace et le besoin de fortes doses pour un effet antitumoral optimal (Raizer et al., 2010).

Les succès cliniques du gefitinib et de l'erlotinib dans les cancers du poumon rendaient pourtant ces molécules d'autant plus prometteuses dans les gliomes. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre la réponse et le niveau d'amplification d'EGFR pour ces deux inhibiteurs. Les raisons évoquées de cet échec incluent une difficulté à passer la barrière hémato-encéphalique ou des mutations non reconnues conférant une résistance (Patel et al., 2012). Des résultats contradictoires apparaissent selon les essais cliniques, mettant en évidence ou non des corrélations entre l'efficacité clinique de ces inhibiteurs avec le niveau de phosphorylation d'AKT et l'expression de PTEN. Par ailleurs, une phosphorylation importante d'AKT permet à la tumeur de négliger l'inhibition d'EGFR (Haas-Kogan et al., 2005). En se basant sur les données acquises dans le cancer du poumon (Pérez-Soler et al., 2004), il est possible que des aberrations génétiques puissent déterminer les patients susceptibles de répondre.

L'inhibition d'EGFR seul n'est donc pas suffisante pour le contrôle de l'activité des voies de signalisations. Pire, l'inhibition totale de l'activité d'EGFR semble activer des voies de signalisation encore plus oncogéniques. Pour les contrer, les recherches futures vont certainement se focaliser sur le développement de combinaisons thérapeutiques rationnelles mais aussi sur la définition de sous-groupes de patients sensibles, comme c'est déjà le cas pour les cancers du poumon non à petites cellules (Leung et al., 2012). Une autre stratégie est de moduler finement l'inhibition d'EGFR pour éviter de déclencher des mécanismes de résistance. L'inhibition des ligands est donc une voie intéressante qui nécessite d'être étudiée plus intensément.

## 3 Intérêt du ciblage du HBEGF dans la thérapie des GBMs

L'activation autocrine d'EGFR médiée par une surexpression de ligand est un mécanisme connu impliqué dans le développement et la progression du cancer (Normanno et al., 2006). À l'inverse des récepteurs, les ligands de la famille de l'EGF sont peu utilisés en tant que cible pour la thérapie anticancéreuse. Cependant certaines études suggèrent qu'une concentration élevée en ligands permettrait aux cellules cancéreuses de contourner les thérapies anti-EGFR (Troiani et al., 2013). Cela laisse suggérer la présence d'une boucle autocrine engendrant une dérégulation dans la signalisation d'EGFR. Le ciblage des ligands est donc une stratégie innovante pour le développement potentiel de nouvelles thérapies.

### 3.1 Rôles du HBEGF dans le cancer

La surexpression du HBEGF est impliquée dans la progression tumorale de nombreux cancers tels que les carcinomes hépatiques, le cancer du colon, le cancer du pancréas, le cancer de la vessie, ou le cancer ovarien (Ito et al., 2001a, 2001b; Itoh et al., 2005; Miyamoto et al., 2004; Ongusaha et al., 2004). Le HBEGF sert de récepteur à la toxine diphtérique (Naglich et al., 1992). Le CRM197, un dérivé inactif de la toxine diphtérique, sert d'ailleurs d'inhibiteur spécifique du HBEGF. Le CRM197 se fixe au HBEGF mature ou à sa proforme ancré à la membrane et est capable d'induire l'apoptose, d'inhiber la migration et l'invasion et de diminuer la croissance.

En analysant l'expression des différents ligands d'EGFR dans une variété de différentes lignées cancéreuses, Yotsumoto *et al.* ont identifié le HBEGF et l'amphiréguline comme cibles potentielles de thérapie (Yotsumoto et al., 2008). Le HBEGF en particulier est surexprimé dans différents types de cancers dont les cancers de la vessie, du sein, du colon, du foie, de l'ovaire, du pancréas, de la prostate et les GBMs. Le HBEGF joue un rôle critique dans la formation tumorale du cancer de l'ovaire (Miyamoto et al., 2004). Par ailleurs l'inhibition du HBEGF par le CRM197, un inhibiteur spécifique se liant au domaine EGF-like du HBEGF, a un effet antitumoral dans ce type de cancer, en synergie avec le paclitaxel (Yagi et al., 2009). Le HBEGF est un inducteur de plusieurs comportements oncogéniques tels que la croissance et la migration *in vitro* mais aussi la croissance et l'angiogenèse *in vivo* comme le montre l'expression stable sa forme soluble ou ancré à la membrane dans des cellules du

cancer de la vessie (Ongusaha et al., 2004). Le HBEGF est typiquement exprimé dans les cellules épithéliales mais il est retrouvé aussi dans le stroma, l'endothélium et dans certains organes qui exercent des effets paracrines sur les cellules cancéreuses (Adam et al., 1999; Nolan-Stevaux et al., 2010). L'expression du gène *HBEGF* est la cible de plusieurs oncogènes comme v-jun, Raf et Ras et peut donc promouvoir la prolifération suite à la transformation oncogénique (Fu et al., 1999; McCarthy et al., 1995).. La surexpression du HBEGF combinée à une mutation de *Kras* est suffisante pour induire une transformation néoplasique rapide des cellules du pancréas (Ray et al., 2013).

Les GBMs quant à eux ont une forte expression d'ADAM12 (a desintegrin and metalloprotease 12) qui favorise le clivage et la libération de l'HBEGF (Kodama et al., 2004). Les lignées de GBMs perdent l'expression des mutants d'EGFR tels qu'EGFRvIII lors du passage en culture. L'induction de l'expression d'EGFRvIII dans la lignée de GBM primaire U251 augmente l'expression du TGF- $\alpha$  et du HBEGF, ce dernier engendre par ailleurs une boucle d'activation sur l'EGFR sauvage (Ramnarain et al., 2006).

### **3.2 Activités du HBEGF dépendantes des récepteurs**

Le HBEGF peut se lier à l'EGFR mais aussi à HER4 de manière paracrine ou juxtacrine (Figure 22). Les effets biologiques du HBEGF sur l'EGFR et HER4 sont distincts. L'interaction du HBEGF avec EGFR promeut la prolifération et la survie en activant des voies de signalisation qui convergent vers Raf/Ras/MEK/ERK et PI3K/AKT (Yarden and Sliwkowski, 2001). La liaison HBEGF/HER4 quant à elle induit la chemotaxie et la migration (Elenius et al., 1997).

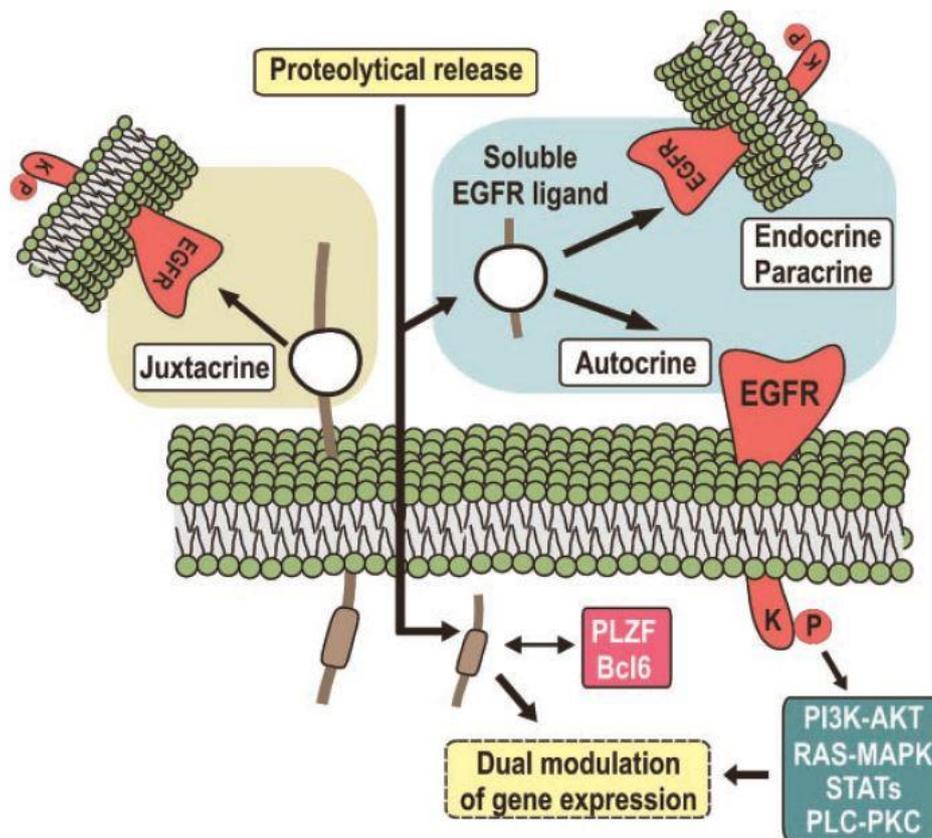
Diverses études ont montré que la proforme du HBEGF ancrée à la membrane possède une activité propre différente du HBEGF soluble. Alors que le proHBEGF prévient de l'apoptose induite par le TGF- $\alpha$  *in vitro* dans des cellules hépatiques, cette fonction n'a pas pu être retrouvée avec du HBEGF soluble (Miyoshi et al., 1997). De même, le proHBEGF, par son interaction juxtacrine avec EGFR protège les cellules épithéliales de l'anoikis tout en maintenant le phénotype épithélial (Singh et al., 2007). Les formes membranaires et solubles du HBEGF régulent des fonctions distinctes des îlots pancréatiques. La régulation du ratio d'expression de ces deux formes permet un ajustement de la sensibilité des îlots au glucose (Ray et al., 2009). Un stimulus de blessure entraîne le clivage du proHBEGF qui stimule la migration et la prolifération des kératinocytes (Tokumar et al., 2000). L'abolition du clivage

du HBEGF résulte en de sévères anomalies du cœur et de la peau (Yamazaki et al., 2003). Plus de la moitié des souris HBEGF<sup>-/-</sup> meurent durant la première semaine, les survivantes ont des dysfonctionnements du cœur qui réduisent leur espérance de vie (Iwamoto et al., 2003).

### 3.3 Activités du HBEGF indépendantes des récepteurs

Des études récentes ont démontré que la partie cytoplasmique du HBEGF appelée HBEGF-CTF (HBEGF- C-terminal fragment) est active indépendamment des récepteurs (Figure 22). Après son clivage, le HBEGF-CTF a une activité intracellulaire qui est indépendante du proHBEGF. Le HBEGF-CTF est capable de subir une translocation au noyau où il induit l'export nucléaire du répresseur transcriptionnel PLZF. PLZF est un répresseur transcriptionnel séquence-spécifique et inhibiteur de la progression dans le cycle cellulaire. Il achève ses effets grâce à un domaine à doigt de zinc sur les promoteurs de gènes tels que la cycline A. Son export du noyau empêche son action inhibitrice et promeut la progression dans le cycle (Nanba et al., 2003). Ce mécanisme est associé à un phénotype plus agressif dans le cancer de la vessie. HBEGF-CTF agit aussi sur un autre répresseur de la transcription, BCL6 mais dans ce cas il inhibe ses fonctions en induisant sa dégradation (Kinugasa et al., 2007). Il a aussi été montré que la localisation nucléaire de HBEGF-CTF est associée à un phénotype plus agressif dans le cancer de la vessie (Adam et al., 2003). La régulation de ces activités pourrait être dépendante d'une phosphorylation directe du HBEGF-CTF (Wang et al., 2006).

La proforme du HBEGF semble aussi avoir un rôle intracytoplasmique. À l'aide de la technique du double hybride, BAG-1 a été identifié comme partenaire du proHBEGF auquel il peut se lier par son domaine cytoplasmique ce qui augmenterait sa fonction prosurvie (Lin et al., 2001a). BAG-1 (Bcl2-associated Athano-Gene 1) est une protéine cochaperonne multifonction qui est impliquée dans différents processus cellulaires liés à la survie (Townsend et al., 2003, 2005). L'extinction de BAG-1 dans des lignées de leucémies myéloïdes aigües est associée à une diminution de l'expression de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1. Dans le cas de Mcl-1, BAG-1 le protège de sa dégradation par le protéasome en contrôlant l'expression de la déubiquitinase USP9X (Aveic et al., 2011).



**Figure 22 Activités du HBEGF** (Schneider et Wolf, 2009)

### 3.4 HBEGF et résistance à la chimiothérapie

Parmi les ligands d'EGFR, le HBEGF en particulier est induit rapidement lors d'un traitement par chimiothérapie et contribue à la résistance par une activation du récepteur (Wang et al., 2007). Il intervient aussi dans l'activation d'EGFR lors d'une inhibition du protéasome dans les cellules du cancer du pancréas (Sloss et al., 2010). Il est proposé pour le moment que cette augmentation du HBEGF puisse être due à une transcription dépendante d'AP-1/NFκB et à une amélioration de la stabilité de son ARNm. Ces deux phénomènes non exclusifs contribuent à une augmentation de l'expression protéique du HBEGF (Sorensen et al., 2006; Wang et al., 2007).

La résistance à la chimiothérapie médiée par le HBEGF passe aussi par le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). En effet, Les cellules de cancer ovarien traitées avec du HBEGF recombinant montrent une diminution de leur niveau de la E-cadherine et une surexpression de Snail, un régulateur clé de l'EMT. Le HBEGF peut alors

contribué à la promotion de métastase via l'induction de l'EMT (Yagi et al., 2009). Le HBEGF induit la migration et l'invasion des cellules du cancer de la prostate via une activation directe ou indirecte d'EGFR (Adam et al., 1999).

En réponse à l'inhibition d'EGFR dans un modèle de tumeur pancréatique, la sécrétion d'HBEGF stimule l'angiogenèse par une activation d'EGFR dans les cellules périvasculaires associées à la tumeur (Nolan-Stevaux et al., 2010). Dans ce même modèle les auteurs montrent que la sécrétion de TGF- $\alpha$  protège les cellules tumorales de l'apoptose. Les deux ligands ont donc des rôles distincts dans la réponse au traitement.

Le proHBEGF, mais aussi l'EGF et le TGF- $\alpha$  ont été retrouvés dans le noyau (Adam et al., 2003; Raper et al., 1987; Schausberger et al., 2003). Pour le proHBEGF cette translocation est corrélée avec un phénotype agressif des carcinomes transitionnels de la vessie. Le fait que les ligands puissent aussi aller au noyau suggère que des associations ligand/récepteur puissent aussi le faire. C'est en effet le cas puisque du cross-linking a permis d'identifier le complexe EGF/EGFR dans le noyau (Lin et al., 2001b). Cependant d'après Adam *et al.*, la présence du proHBEGF au noyau n'est pas corrélée avec celle d'EGFR ce qui laisse penser un rôle indépendant du récepteur.

## E. OBJECTIFS DE LA THESE

Le TMZ est aujourd'hui devenu le traitement de référence pour les GBMs. Afin d'améliorer son efficacité, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes de mort mis en jeu par cet agent alkylant. C'est pourquoi nous nous intéresserons dans une première partie à l'implication des protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak mais aussi à l'autophagie dans la mort induite par le TMZ.

Malgré l'emploi du TMZ, la récurrence des tumeurs est inévitable. Les mécanismes de résistance connus passent par l'expression de l'enzyme de réparation MGMT mais aussi par l'EGFR. Une inhibition de l'EGFR est efficace *in vitro* mais entraîne l'apparition de voies de signalisation plus agressives en clinique. Ainsi l'identification d'un ou plusieurs ligands d'EGFR impliqués dans la réponse au traitement pourrait ouvrir de nouvelles options pour de futures thérapies ciblées. L'étude des mécanismes de résistance au TMZ dans des lignées de GBMs primaires occupera donc la deuxième partie de cette thèse.

# **MATERIELS & METHODES**

## 1 Culture cellulaire

Les lignées de glioblastome primaire U251 et LN18 sont cultivées avec respectivement 10 et 5% de sérum de veau fœtal (SVF) en milieu DMEM contenant 4,5g de glucose (Gibco). La lignée de glioblastome primaire U87 est cultivée en milieu DMEM contenant 1g de glucose et complété à 10% de SVF. Dans tous les cas, les milieux sont additionnés de pénicilline/streptomycine (100U/ml) et de L-glutamine (2mM).

## 2 Infections lentivirales

Les cellules ont été transduites avec des particules lentivirales Mission® shRNA contre Bax (SHVRS NM\_004324.3), Bak (SHVRS NM\_001188), HBEGF (SHCLNV NM\_001945) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). Cinq séquences ont été vérifiées et après sélection à la puromycine (2µg/ml) celle présentant la meilleure inhibition a été sélectionnée. Des séquences non-spécifiques (SHC 0001V ; SHC 0002V) ont été utilisées en contrôle négatif. La transduction a été effectuée suivant les recommandations.

## 3 Analyse des protéines totales par Western Blot

Les cellules adhérentes sont récupérées et rincées avec du PBS. Les culots cellulaires sont lysés totalement 30min sur glace dans un volume équivalent de tampon RIPA ou bien de tampon PhosphoSafe pour l'étude des protéines phosphorylées. Après 15 min de centrifugation à 13000g le surnageant est récupéré et la quantité de protéines totales est déterminée par le kit BCA (Interchim).

Pour les électrophorèses en conditions dénaturantes, entre 30 et 50µg de protéines sont déposés sur des gels de polyacrylamide de 8, 10 ou 15% en fonction de la taille des protéines d'intérêt. Ensuite les protéines sont transférées sur membrane PVDF (Immobilon®, Millipore) par transfert liquide sur la nuit à 30V en chambre froide. La membrane est saturée 30 min dans du TBS-0,05% Tween-5% lait puis marquée avec l'anticorps primaire dans du TBS-0,05% Tween-1% lait sur la nuit. L'anticorps secondaire approprié, couplé à la peroxidase, est appliqué pendant une heure à température ambiante. Après lavages, le signal est détecté par ajout du substrat ECL (Immobilon®, Millipore). La lecture de la luminescence

se fait sur un bioimager (Vilbert Lourmat) et l'analyse des bandes est réalisée via le logiciel libre ImageJ.

## **4 Extraction d'ARN et analyse par PCR quantitative**

Les différentes lignées sont ensemencées en plaque 6 puits à  $10^5$  cellules par puits. Après 24h, les cellules sont traitées au TMZ. Les cellules adhérentes sont collectées puis centrifugées 5 min à 1000 rpm, les culots secs sont gardés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les ARN totaux sont extraits à partir des culots cellulaires avec le kit d'extraction Nucleospin RNA (Macherey-Nagel, Hoerd, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Le protocole inclus un traitement à la DNase. La concentration en ARN est déterminée à l'aide d'un spectromètre Nanodrop® (Nanodrop Technologies), tandis que la qualité des ARN a été vérifiée en utilisant le Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA) et le kit Labchip RNA 6000. La rétrotranscription des ARN totaux (1  $\mu\text{g}$ ) a été réalisée avec le kit Superscript II (Invitrogen, France) ou le kit Maxima Reverse Transcriptase (ThermoScientific, France). L'ADNc obtenu a été dilué à une concentration finale de  $20\text{ng}/\mu\text{l}$  pour être ensuite utilisé en QPCR.

L'analyse en QPCR a été réalisée avec le kit Brilliant SYBR Green QPCR Master reagent (Agilent, Santa Clara, CA) sur un thermocycleur MX3005P (Multiplex Quantitative PCR System, Agilent). Le programme était le suivant : 10 min à  $95^{\circ}\text{C}$  puis 40 cycles avec 30 sec à  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 sec à la température d'hybridation spécifique de l'amorce, 30 sec à  $72^{\circ}\text{C}$ . Les gènes de référence utilisés sont GAPDH et RPLP0. Tous les échantillons ont été traités en duplicat. Pour chaque couple d'amorces, l'efficacité et la linéarité de la réaction sont déterminées à l'aide d'une gamme étalon (20-0.01ng) établie à partir d'ARN universel (Agilent) ou bien d'ARN issu de cellules U87 dans le cas du HBEGF. Les calculs sont réalisés grâce à la méthode de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

## **5 Extraction d'ADN et bisulfitation**

L'ADN des cellules est extrait grâce au kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Hoerd, Allemagne) suivant les recommandations du fabricant. La bisulfitation (conversion des cytosines non méthylées en uraciles) de l'ADN (250ng) est réalisée grâce au kit EZ DNA

Methylation-Gold (Zymoresearch). L'ADN bisulfite est élué dans 10 $\mu$ l. L'amplification du promoteur est réalisée par « nested PCR ». La première PCR, indépendante de la méthylation, permet l'amplification d'un fragment de 289 paires de bases. Une seconde PCR avec des amorces spécifiques de l'ADN méthylé ou non permettent de déterminer le pourcentage de méthylation (Karayan-Tapon et al., 2010). Des contrôles positifs (ADN méthylé) et négatifs (ADN extrait de lymphocytes) sont inclus.

## 6 Test de cytotoxicité par MTT

La cytotoxicité cellulaire est mesurée en plaque 96 puits par colorimétrie. Les cellules sont ensemencées à 2.10<sup>3</sup> cellules par puits. Après 24h elles sont traitées avec les différents inhibiteurs et/ou du TMZ. Soixante-douze heures plus tard, 10 $\mu$ l d'une solution de sel de tétrazolium MTT (concentration finale de 0.5mg/ml) sont ajoutés et les plaques sont incubées à 37°C pendant 4h. Le milieu est ensuite remplacé par 200 $\mu$ l de DMSO 100% et la plaque est lue à 570nm grâce à un spectrophotomètre. Le pourcentage de cytotoxicité est calculé par rapport au témoin non traité.

## 7 Dosage du HBEGF par ELISA

Le kit HBEGF ELISA DuoSet de chez R&D systems a été utilisé suivant les recommandations du fabricant. Pour doser le HBEGF dans le surnageant, les cellules étaient cultivées dans du milieu à 0,1% de SVF. Pour doser le proHBEGF, les extractions de protéines totales ont été faites selon le protocole décrit pour le western blot. Les plaques 96 puits sont incubées sur la nuit avec un premier anticorps primaire anti-HBEGF puis rincées au PBS/BSA 0,1%. Les lysats de cellules préalablement dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans du PBS/BSA 0,1% et les milieux conditionnés sont incubés dans la plaque 96 puits pendant 2h à température ambiante. Après rinçage au PBS-Tween 0,05%, un second anticorps anti-HBEGF couplé à la biotine est ajouté pour 1h à température ambiante. De nouveau les puits sont rincés et la streptavidine conjuguée à une peroxidase est incubée pour 30min. Enfin l'activité de la peroxidase est mesurée en utilisant du 3,3',5,5'-tétraméthyl benzidine (TMB) pendant 30min. La réaction est stoppée par de l'acide sulfurique à 1M et la colorimétrie est lue à 450nm grâce à un spectrophotomètre.

## 8 Immunocytochimie

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles disposées dans des plaques 24 puits. Après les différents traitements, les cellules sont fixées avec du PBS-paraformaldéhyde 4% pendant 15 min à température ambiante. Après lavages au PBS, les cellules sont perméabilisées avec du PBS-SDS 0,1% pendant 10 à température ambiante puis saturées avec du PBS-BSA 5% pendant 30 min. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS-BSA 1% sur la nuit à 4°C en chambre humide après lavages au PBS. Les anticorps secondaires correspondant utilisés sont couplés à un fluorochrome (Alexa 568 ou 633, Molecular Probes) et laissés 30 min à température ambiante. Le noyau des cellules est marqué avec du Draq5 puis les lamelles sont montées sur lame avec du Mowiol (Sigma-Aldrich) ou bien directement à l'aide de Prolong Gold antifade (LifeTechnologies) contenant du DAPI. La fluorescence est visualisée en utilisant un microscope Axiovert 200M (Zeiss, Le Pecq, France) possédant un module ApoTome (x63 et ouverture numérique de 1,4). L'analyse des images est réalisée grâce au logiciel libre ImageJ.

## 9 Marquage *in vivo* MDH

Les cellules sont cultivées sur une lamelle en verre Nunc Lab-TeK® (Sigma-Aldrich) en présence ou non de TMZ. En tant que contrôle positif de l'autophagie, des cellules sont aussi cultivées 6h en milieu sans acides aminés HBSS, 0,1% BSA, 0,1 mg/ml MgCl<sub>2</sub>. Aux temps indiqués, les cellules sont incubées 30 min avec du MDH Fluorescent Dye à 37°C puis lavées avec du PBS. Afin de détecter plus facilement les cellules, la membrane cellulaire est marquée avec du PKH26 (Sigma-Aldrich) pendant 10 min à température ambiante et lavées avec du DMEM puis du PBS. Les cellules sont regardées immédiatement avec un microscope Axiovert 200M (Zeiss, Le Pecq, France) possédant un module ApoTome (x63 et ouverture numérique de 1,4). L'analyse des images est réalisée grâce logiciel libre ImageJ.

## 10 Test de proximité par ligation *in situ* (P-LISA)

Cette technique permet de quantifier les interactions entre deux protéines qui apparaissent sous forme de points dans les cellules. Les deux protéines doivent être marquées

avec des anticorps primaires d'origine différente puis des anticorps secondaires spéciaux couplé à une séquence nucléotidique sont ajoutés. Si les protéines d'intérêt sont assez proches l'une de l'autre, les séquences peuvent s'hybrider à une sonde, être amplifié puis marqué par fluorescence.

Les cellules sont fixées avec du PBS-paraformaldéhyde 4% pendant 15 min à température ambiante. Après un rinçage au PBS, les cellules sont perméabilisées avec du PBS-SDS 0,1% pendant 10 à température ambiante. La saturation, l'immunomarquage, l'hybridation, la ligation, l'amplification et la détection sont réalisées suivant les recommandations du fabricant (Olink Bioscience). Pendant ces étapes, toutes les incubations sont réalisées en chambre humide. L'amplification et la détection se font à l'abri de la lumière. Les préparations sont ensuite montées sur lames en utilisant du Prolong Gold antifade (LifeTechnologies) contenant du DAPI. La fluorescence est visualisée sur un microscope axiovert 200M (Zeiss, Le Pecq, France) possédant un module ApoTome (x63 et ouverture numérique de 1,4). L'analyse des points par cellule est réalisée grâce au plugin 3D counter sur le logiciel libre ImageJ.

## 11 Essai caspase

Les différentes lignées sontensemencées en plaque 6 puits à  $10^5$  cellules par puits. Après 24h, du TMZ ou différents inhibiteurs sont ajoutés. Soixante-douze plus tard, le surnageant et les cellules trypsinisées sont récupérées pour être lysés totalement par du tampon RIPA. La concentration en protéine est déterminée par dosage colorimétrique avec le kit BCA protein assay (Pierce, IL). L'activité DEVDase est mesurée par fluorimétrie dans des plaques 96 puits à fond plat. Une concentration de 10 ou 25 $\mu$ g de protéine est utilisée pour un volume final de 100 $\mu$ l avec 32  $\mu$ l de tampon (312.5 mM HEPES pH 7.2, 31.25 % sucrose, 0.3125 % CHAPS, inhibiteurs de protéases (Roche)), 10  $\mu$ l de DTT 100 mM, 2 $\mu$ l de substrat ac-DEVD-AMC (Promega) à la concentration finale de 50 $\mu$ M. La fluorescence est mesurée à 465nm après une excitation à 365 nm toutes les 15 min pendant 2h avec un spectrofluorimètre Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France). L'activité spécifique est calculée à partir de la pente de la courbe DO = f(temps) et rapportée à la concentration de protéines utilisées.

## 12 Test de réparation de blessure

Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence puis sont laissées dans un milieu à 0,1% SVF avec ou sans TMZ pendant 24h. Une blessure est alors réalisée à l'aide d'un cône de 200 µl et une première photo est prise. Vingt-quatre heures après une nouvelle photo est prise et la surface comblée par les cellules est calculée grâce au logiciel libre ImageJ.

## 13 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au programme GraphPad Prism 5 en utilisant de t-Tests non appariés. Les différences significatives sont indiquées comme suit :  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*) et  $p < 0,0005$  (\*\*\*). Sauf mention contraire, tous les résultats présentés sont issus de l'analyse d'au moins trois expériences indépendantes.

## 14 Produits

Le TMZ a été acheté chez Interchim (Montluçon, France). L'étoposide provient de Mylan Pharmaceuticals (Morgantown, WV).

Les inhibiteurs de la voie EGFR proviennent du kit InhibitorSelect EGFR Signaling Pathway Inhibitor Panel (Calbiochem, Merck, Lyon, France). Le CRM197 a été acheté chez Calbiochem (Merck, Lyon, France).

## 15 Anticorps

Anticorps	PM kDa	Espèce	Référence	Application
<b>ATR</b>	250	Lapin	Cell Signaling #2790	WB
<b>pATR (S428)</b>	250	Lapin	Cell Signaling #2853	WB
<b>Bak</b>	28	Lapin	Pharmingen #556396	WB
<b>BAG-1</b>	36	Lapin	Santa Cruz C-16	WB, PLISA
<b>Bcl-2</b>	26	Souris	Santa Cruz C-2	WB
<b>Bcl-xL</b>	30	Lapin	Santa Cruz H-62	WB
<b>Bax</b>	22	Lapin	Pharmingen #556467	WB
<b>EGFR</b>	180	Lapin	Cell Signaling XP® #4267	WB, PLISA

---

<b>pEGFR (Y1068)</b>	180	Lapin	Cell Signaling XP® #3777	WB
<b>pTyr-100</b>	180	Souris	Cell Signaling #9411	PLISA
<b>pH2AX (S139)</b>	15	Souris	Millipore #05-636	WB, IC
<b>HBEGF</b>	22	Chèvre	Santa Cruz C-18	IC, PLISA
<b>HBEGF</b>	22	Lapin	Santa Cruz H-88	PLISA
<b>HBEGF</b>	22	Chèvre	Santa Cruz C-14	PLISA
<b>LC3B</b>	16-18	Lapin	Cell Signaling #2775	WB
<b>Mcl-1</b>	37	Lapin	Santa Cruz S-19	WB, PLISA
<b>MGMT</b>	22	Souris	Millipore MAB16200	WB
<b>Noxa</b>	16	Souris	Enzo Life Science	WB
<b>p62</b>	62	Lapin	Cell Signaling #5114	WB
<b>Survivine</b>	16	Lapin	Calbiochem #574660	WB
<b>USP9X</b>	300	Souris	Santa Cruz E-12	WB, PLISA

# RESULTATS

## **A. LE TMZ ET L'INDUCTION DE LA MORT CELLULAIRE**

En tant que génotoxique le TMZ induit des réponses cellulaires variées telles que l'autophagie, l'apoptose, la nécrose ou la sénescence (Knizhnik et al., 2013). Ces réponses interviennent de manière complexe et dépendent du phénotype cellulaire. Les mécanismes apoptotiques déclenchés par le TMZ sont encore inconnus. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) est une étape clé dans l'activation des caspases effectrices. Ce phénomène est dépendant de l'insertion dans la membrane mitochondriale des deux principales protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak. C'est pourquoi nous avons analysé l'implication de ces deux protéines dans l'induction de l'apoptose par le TMZ. En parallèle nous avons aussi regardé si le TMZ pouvait induire une réponse autophagique.

### **1 Implication de l'axe Mcl-1/Bak dans l'apoptose induite par le TMZ.**

**Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma**

Catherine Gratas<sup>1,2,3</sup>, Quentin Séry<sup>1,2,4</sup>, Marion Rabé<sup>1,2</sup>, Lisa Oliver<sup>1, 2, 3</sup> and François M. Vallette<sup>1,2,4\*</sup>

1. Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, UMR INSERM 892 / CNRS 6299
2. Université de Nantes, Nantes F-44000, France
3. CHU de Nantes, Nantes F-44805, France.
4. Institut de Cancérologie de l'Ouest-Centre René Gauducheau, St Herblain F-44805, France

Running title: Bak mediates TMZ induced apoptosis in glioma

Key words: temozolomide, glioma, apoptosis, Bcl-2 family

Abbreviations: GBM: glioblastoma multiforme; MGMT: O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyl transferase; TMZ: temozolomide.

\* to whom correspondence should be addressed at :

Dr F.M. Vallette

IRSUN-CRCNA

UMR 892 Inserm/ 6299 CNRS /Université de Nantes

8, quai Moncousu , BP70721, 44007 Nantes Cedex 1, France

e-mail: francois.vallette@inserm.fr

Fax: 33-228080204

Tel: 33-228080324

## Abstract

Temozolomide (TMZ) is an alkylating agent used for the treatment of glioblastoma multiforme (GBM), the main form of human brain tumours in the adults. It has been reported that TMZ induced DNA lesions that subsequently trigger cell death but the actual mechanisms involved in the process are still unclear. We investigated the implication of major proteins of the Bcl-2 family in TMZ-induced cell death in GBM cell lines at concentrations close to that reached in brain during the treatments. We did not observe modulation of autophagy at these concentrations but we found an induction of apoptosis. Using RNA interference, we showed that TMZ induced apoptosis is dependent of the proapoptotic protein Bak but independent of the proapoptotic protein Bax. Apoptosis was not enhanced by ABT-737, an inhibitor of Bcl-2/Bcl-X1/Bcl-W but not Mcl-1. The knock-down of Mcl-1 expression increased TMZ induced apoptosis. Our results identify a Mcl-1/Bak axis for TMZ induced apoptosis in GBM and thus unravel a target to overcome therapeutic sensitivity toward TMZ.

## Introduction

*Glioblastoma multiforme* (GBM), the most common form of brain cancer in the adults, are highly resistant to current treatments. The 2-year survival rate remains low as most of the tumours recur despite the aggressive treatment combining surgery, radio and chemotherapy (1). Recently, the introduction of temozolomide (TMZ) in association with radiotherapy in the treatment of GBM has produced a small but significant over survival in a subset of patients (2). The cytotoxicity of TMZ is mainly mediated by the generation of O<sup>6</sup>methyl-guanine in DNA, which triggers cell cycle dependent DNA damage and ensuing cell death (3). The expression of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) limits TMZ therapeutic efficacy by removing O<sup>6</sup>-methylguanine (4).

So far, the only prognostic/predictive factor for longer survival after TMZ treatment is the partial or total silencing of MGMT through methylation of its gene promoter which favours TMZ induced major defect in DNA repair (4). However, both in vitro and in vivo, cell death triggered by TMZ at therapeutic doses is still low even in MGMT silenced tumours (3). This means that other factors, which are currently not known, are probably involved in GBM resistance. The precise mechanism of cell death triggered by TMZ, is still subject to controversial discussion and studies of the association of TMZ with other drugs indeed revealed a complex array of mechanisms implicated in TMZ cytotoxicity (5). It has been reported that TMZ through the production of O<sup>6</sup>-methylguanine was inducing apoptosis (6).

However, the actual apoptotic mechanism triggering and amplifying the response to TMZ is still unknown as contradictory results have been published (see for example references 7 and 8). Moreover the importance of apoptosis has been challenged by others who observed predominantly an induction of autophagy after TMZ treatment of glioma cell lines (9). Apoptosis and autophagy are both cell death programs but the latter is also an essential component of cellular survival mechanism which plays an important role in cancer (10). TMZ was although shown to induce mitotic catastrophe in p53-deficient gliomas cells (11). Additional signalling pathways have been associated with TMZ cytotoxicity such as G2/M check point integrity (12), up-regulation of miR-21 (13), induction of senescence (11, 14), and elevated AMP-activated Protein Kinase (15).

However, in most of these studies, the concentrations of TMZ used were far greater than that achieved during GBM treatment (i.e.  $\geq 50 \mu\text{M}$ ) and thus did not necessarily reflect TMZ actual toxicity in patients. We thus decided to evaluate the implication of proteins of the Bcl-2 family at TMZ therapeutic doses (16) as members of this family are central in the control of both apoptosis and autophagy downstream of DNA damage (17-20).

## Results

### *Effect of TMZ on the induction of cell death and cell cycle in glioma cell lines*

We used a human glioma cell line which does not express MGMT, U251, but with a mutant p53 status. We used TMZ concentrations up to  $50 \mu\text{M}$ , concentration closed to the AUC in brain ( $31 \pm 6.2 \mu\text{M}/\text{h}$ ) described by Ostermann et al. (16). To analyze cell death after temozolomide treatment, we used a LDH assay (see materials and methods). The LDH activity in the supernatant was only moderately increased after incubation for 3 days with both TMZ concentrations (i.e.  $12.5$  and  $50 \mu\text{M}$ ) (**Figure 23A**).

In cells treated for up to 72 hrs in the continuous presence of TMZ, apoptosis was quantified every 24 hrs by the measure of caspase 3 activity (i.e. DEVDase activity) as described in materials and methods. As showed in **Figure 23B**, caspase activity was only increased after 72 hrs at  $12.5$  and  $50 \mu\text{M}$  TMZ. In presence of the inhibitor of DEVDase activity (**DEVD-CHO**), no caspase activity was observed (**Figure S1**). Block in G2/M has been proposed as the main effect of TMZ on glioma (11). As shown in **Figure 23C**, TMZ induced a block in G2/M in U251 cell line at both concentrations with similar amplitude. At higher dose (i.e.  $100 \mu\text{M}$ ), it has been reported that TMZ induced autophagy, but not

apoptosis in malignant glioma cells (9). Autophagy can be monitored by the analysis of the conversion of soluble LC3-I to lipid bound LC3-II which is associated with the formation of autophagosomes. We used LC3 antibodies to detect autophagy. As shown in **Figure 23D**, the incubation of U251 with 50  $\mu$ M TMZ did not trigger autophagy. Similar results were obtained with other markers of autophagy such as autophagosome labelling with monodansylpentane (MDH) and degradation of p62/ SQSTM1, a LC3-II partner (**data not shown**). From these results, we conclude that TMZ at concentrations inferior to 100  $\mu$ M, apoptosis prevail over autophagy under our conditions.

*Role of Bcl-2, Bcl-Xl and Mcl-1 in U251 response to TMZ*

Bcl-2 family members are regulator of apoptosis (18). We thus analyzed the expression of several key members of the Bcl-2 family after TMZ treatments at 12.5 or 50  $\mu$ M concentrations: namely Mcl-1 and Bcl-2, two anti apoptotic member of the Bcl-2 family and Bax and Bak, two pro apoptotic member of Bcl-2 family . As illustrated in **Figure 24A**, the expression of mRNA encoding for Bcl-2, quantified by Q-PCR (see materials and methods) was significantly increased in cells surviving TMZ treatment (i.e. living cells) at 50  $\mu$ M after 48 and 72 hrs. On the other hand, little or no differences were observed for the expression of Mcl-1, Bax and Bak after the treatment (**Figure 24A**). Next, we examined the expression of these proteins by immunoblots. As illustrated in **Figure 24B**, TMZ did not induce any change in the expression of Bax and Bak at the protein level. On the other hand, the expression of Bcl-2 was increased and that of Mcl-1 considerably reduced during the treatment. Several small molecules have been selected on the basis of their anti-Bcl-2 activity and among them ABT 737 has been shown to be a more potent inhibitor of Bcl-2/Bcl-Xl/ Bcl-W but not of Mcl-1 (22). The treatment of U251 cell line with ABT-737 in the presence of TMZ, did not affect cell apoptosis significantly (**Figure 24C**), ruling out the involvement of Bcl-2/Bcl-Xl/ Bcl-W in the inhibition of TMZ induced apoptosis. To examine the importance of Mcl-1 in TMZ induced cell death, we treated the cells with Si-RNAs designed to inhibit the expression of Mcl-1 (**Figure S2A**). As illustrated in **Figure 24D**, the silencing of Mcl-1 expression enhanced apoptosis induced by TMZ in U251 cell line even at the lowest concentration (i.e. 12.5  $\mu$ M), when the amount of Mcl-1 was not affected (**Figure S2A**). Of note, at the higher concentration (i.e. 50  $\mu$ M), all cells with silenced Mcl-1 were killed by the TMZ treatment (**data not shown**). These results showed for the first time that Mcl-1 play an important role in TMZ induced apoptosis.

*Role of Bax and Bak in U251 response to TMZ*

The expression of Bax and Bak did not appear to be modulated by TMZ treatment. However these proteins, depending on the nature of the death inducing agent, do not exhibit similar sensitivities or implications during apoptosis (23). To examine the role each of these proteins play in TMZ response we knocked down the expression of Bax or Bak in U251 by RNA interference (**Figure S2B and C**). When Sh-Bax treated cells were incubated with TMZ, we observed little or no influence on induced apoptosis (**Figure 25A**). Conversely, the knock down of Bak expression significantly decreased the induction of caspase activity by TMZ treatment (**Figure 25B**). Of note, in sh-Bak treated cells, a slight decrease in its necrosis related cytotoxicity was observed as evidenced by LDH activity measurements (**Figure 25C**). Of note, the effect of Bak on apoptosis was not dose dependent (**Figure 25D**) and no effect on cell cycling was observed in TMZ treated control and Sh-RNA Bak or Bax U251 (**data not shown**).

It has been shown that in TMZ treated glioma cell line, that repair of O<sup>6</sup>-methylguanine (O<sup>6</sup>-MeG) by MGMT prevented apoptosis (6). We thus expressed MGMT in U251 cell line (**Figure S3**) which otherwise does not express this enzyme. The expression of MGMT decreased the response of U251 to TMZ as expected (**Figure 26**). However, the expression of MGMT in U251 did not change the specific role of Bak in TMZ toxicity (**Figure 26**).

*LN18 exhibited similar Bak/Mcl-1 specificity toward TMZ induced apoptosis*

We analyzed the implication of Bak in TMZ induced apoptosis in LN18 a PTEN/MGMT positive cell line. As shown in **Figure 27A**, the induction of apoptosis required concentration of TMZ superior to that observed for U251 (i.e. 250 to 750 μM). The knock down of the expression of Mcl-1 (**Figure S4A**) has a deep influence on TMZ induced apoptosis (**Figure 27B**) while that of Bax (**Figure S4B**) has a little influence on cell survival except for the highest concentration (i.e. 750 μM) (**Figure 27C**). On the other hand, the decrease of the expression of Bak (**Figure S4C**) inhibited significantly at all concentrations, TMZ induced apoptosis (**Figure 27D**).

**Discussion**

The introduction of Temozolomide/ irradiation regimen in the treatment of gliomas has significantly improved the outcome of patients (1-2). However, benefit in terms of

survival is mainly restricted to some patients exhibiting MGMT promoter methylation (4, 25). Indeed, the MGMT promoter could be predictive or prognostic for a sub-group of gliomas that are exhibiting specific gene methylation profile and/or more sensitive to cell death induction as suggested by our previous studies (26). We have particularly shown that a DNA-methylating factor, such as the folic acid, induced limited cellular proliferation and increased the sensitivity to TMZ-induced apoptosis in glioma cells (27). Of note, among silenced genes, several were implicated in apoptosis such as survivin, and Bcl-W and others such as MGMT specifically implicated in DNA repair and response to TMZ (27).

Despite numerous works, the mechanisms by which TMZ induce cell death in cancer cells remain elusive. It has been proposed that the main features of TMZ cytotoxicity was associated with induction of cell death or cell cycle arrest (4). In the present study, we show that TMZ at concentration equal or inferior to that achieved during patients treatment (16), induced a type of cell death which is quantitatively and qualitatively different from that described by others at higher concentrations (i.e. >100  $\mu$ M). As illustrated in **Figure 23**, apoptosis was always limited in treated glioma cell lines. On the other hand, no or little effect on autophagy was observed at these TMZ concentrations (**Figure 23**). However, we observed that TMZ induced cell death was a mixture of apoptosis and another cell death programme which remain to be identified.

Since the Bcl-2 family members are central to most cell death programmes, we have investigated the roles of some of its key members in TMZ induced cytotoxicity. It has been reported that TMZ at high concentrations (i.e. > 100  $\mu$ M) induced a change of the Bax: Bcl-2 ratio which was instrumental to its cytotoxicity through enhancement of apoptosis and/or autophagy (6-9). In this study, we did not observe any change in the expression of Mcl-1, Bax or Bak upon TMZ treatments at lower concentrations. Pharmacological inhibition of Bcl-2/Bcl-Xl/ Bcl-W by ABT 737 did not affect cell death under our conditions while the knock down of the expression of Mcl-1 affected apoptosis (**Figure 24**). Similarly, the knock down of Bax expression did not affect TMZ induced apoptosis while that of Bak inhibited this cell death programme. This feature was conserved in the presence of MGMT (**Figure 26**). Quite remarkably, such a difference was not found for necrosis-like cell death quantified by the release of LDH where Bax and Bak appeared to play similar roles (**Figures 23**). However, neither Bax and Bak have an influence on autophagy upon TMZ treatment (**data not shown**). We, and others, have shown distinct roles for Bax and Bak especially in linking chemotherapeutic drugs or death receptors pathways to the mitochondrial apoptosis signalling

cascade (23, 28, 29, 30). These differences have been associated with the extent of the inhibitory effect of Mcl-1 on Bak (29). Interestingly, recent results suggest that the alkylating DNA-damage agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced cell death through a caspase independent but Bax dependent pathway called necroptosis (31). Further investigations are necessary to verify if TMZ under our conditions induced both a Bax dependent necroptosis and a Bak dependent apoptosis. Similarly, the implication of members of the Bcl-2 family should be examined in the new therapeutic targets that have been recently described (32-36).

Altogether, we have identified in this work a Mcl-1/Bak axis implicated in TMZ induced apoptosis in two different glioma cell lines. These cell lines differ in their PTEN and MGMT status, two features that influence their response to TMZ. We also show that upon TMZ treatment Mcl-1 expression is not modified at the transcriptomic level but at the protein level. This suggests that targeting Mcl-1 either by competitive inhibitors of its interaction with Bak or by promoting its degradation is a potentially important target in glioma.

In addition, our results suggest that Bax is not involved in the apoptotic pathway (i.e. activation of caspase 3) but is nonetheless associated with cytotoxicity at concentrations that are likely to be reached during treatments of GBM patients. Thus a better understanding of this non canonical cell death programme induced by TMZ might be important to improve the efficacy of GBM patient's treatment.

## Materials and Methods

**Reagents and Materials.** All reagents were from Sigma except for the Temozolomide (TMZ) obtained from Interchim (Paris, France). The stock solution of TMZ was obtained by dissolution of the TMZ in DMSO at 100mM. Aliquots were frozen at -20°C and dilutions to the appropriate concentrations were done in culture medium just before the experiment. The following antibodies were used: Mcl-1 (Santa Cruz), Bax (□2D2, Sigma), Bak (556396- BD-Pharmingen USA), SQSTM1/p62 (5114-Cell Signaling) and LC3B (2775- Cell Signaling), □ Tubulin (T0198-Sigma), □Actin (clone C4,MAB1501, Millipore). Secondary mouse and rabbit antibodies were from Jackson ImmunoResearch (UK). For MGMT transfection the plasmid pDEST 12.2 was obtained from In Vitrogen, Life technologies (CA) and the MGMT cDNA from ATCC, clone MGC-5186.

## **Methods:**

**Cell culture.** U251 cell line and its derivatives were grown in high-glucose Dulbecco Modified Medium enriched with 10% fetal calf serum, antibiotics and glutamine (In Vitrogen, Life technologies, CA). Cells were maintained in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

**Cell cycle analysis.** Cells were plated in 6 well-plates, treated by TMZ for the respective time and collected by trypsinization. After fixation in 70% alcohol, cells were stained with propidium iodide (8µg/ml) in presence of RNaseA-DNase free (Amresco, OH, USA). Cells were then analysed on a BD-Facscan and the Cell Quest software (BD, USA).

**Cell viability assays.** Cell viability was assayed by MTT (37). Cells were seeded in 96 wells plates. Next day drugs were added in 100µL at the indicated concentration and plates were incubated for 72h. Controls contained only drugs vehicles. MTT 0,5mg/ml was then added and after 4 h at 37°C, medium was removed and formazan precipitates were dissolved in DMSO. Optical density was read at 570 nm on a microplate reader (Molecular Device, CA).

## **Knockdown experiments.**

**Lentivirus:** Cells were transduced with MISSION® shRNA Lentiviral Particles against Bax (SHVRS NM\_004324.3) and Bak (SHVRS NM\_001188) as recommended by the manufacturer (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). Five sequences were checked and after cell selection with puromycin (2µg/ml) the one with the best gene inhibition was selected for following experiments. Scramble sequences (SHC001V ; SHC002V) were used as negative controls.

**Si RNA :** To inhibit Mcl-1, Silencer si RNAs (120644- Ambion, Applied Systems) were transfected in U251 cell line, with Lipofectamine RNAi max (In Vitrogen, Life technologies, CA) according to the recommended protocol. Final concentration of si RNA was 10µM. si-RNA-A, sc-37007 , a non targeted si-RNA (Santa-Cruz, CA), was used as negative control. After 48h cells were collected for protein extraction.

**Protein extraction.** Cell lysis was done in ice-cold RIPA buffer containing proteases inhibitors, for 20 min. After centrifugation at 13 000 rpm for 20min, 4°C, protein concentration in the supernatant was measured by BC assay (Uptima, Interchim, France). A standard curve of bovine serum albumin was included in each assay.

**Caspase activity.** DEVDase activity was measured on 25 $\mu$ g proteins with the fluorometric CaspACE assay system (Promega, WI). To check the specificity of the assay, in some cases, measures were done in presence of caspase specific inhibitor DEVD-CHO (38).

**LDH activity.** LDH activity was measured using the Roche diagnostic kit (3004732122) on a Cobas 6000 (Roche Diagnostics GmbH, D-68298, Mannheim). This assay is based on the measure, by UV, of NADH appearance after transformation of lactate in pyruvate by the LDH in presence of NAD. Control medium without cells was used as blank.

**Western Blot.** Proteins were separated on 12% acrylamide gels and transferred to Immobilon-P transfert membrane (Millipore, MA). After 1h incubation with western blocking reagent (Roche, Germany) the primary antibody was incubated O/N at 4°C. Secondary antibodies were applied for 2h at room temperature. Revelation was performed by chemoluminescence using ECL reagent (Roche, Germany) and the fusion FX7 Imager (Erlangen, Germany).

**RNA expression assay.** Cells were grown in 6-wells plate. After treatment, adherent cells were collected and RNA and protein extracted using Nucleospin RNA/Protein kit (Mackerey Nagel, Düren, Germany) according to the given recommendations. DNase treatment was included in the protocol.

The quantity and quality of each RNA were respectively evaluated with the NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) and the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, CA). The RNAs extracted were of good quality and the RNA integrity number (RIN) was >9 in all cases. RNA expression was quantified as previously described (39, 40) except that the instrument was the MX3005P, and the mix was the Brilliant II Sybr Green Master Mix (Agilent, CA). Primers sequences are given in **Table S1**. The housekeeping genes were RPLPO (Ribosomal Protein, Large, PO), and GAPDH .

To insure specificity of the RT-qPCR, an agarose gel electrophoresis was initially performed to check whether a single PCR product was generated and then a melting curve was performed at the end of each RT-qPCR. Linearity and efficiency of the RT-qPCR were checked for each gene with a standard curve of 4 logs prepared with Universal RNA (Stratagene-Agilent, CA). Efficiency was >90% in all cases.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 using unpaired t-Test for group comparisons. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated (\*) on figures.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** This work was supported by grants from the program "Equipe labellisée de la Ligue Nationale contre le Cancer". QS is the recipient of a fellowship from the GBM patients association "En Avant la vie" and the Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO).

### References

1. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008; **359** (5): 492–507.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; **352** (10): 987-96.
3. Bocangel DB, Finkelstein S, Schold SC, Bhakat KK, Mitra S, Kokkinakis DM. Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide. *Clin Cancer Res.* 2002; **8** (8): 2725-34.
4. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; **352** (10): 997-1003.
5. Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada J. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol.* 2012; **2**:98.
6. Roos WP, Batista LF, Naumann SC, Wick W, Weller M, Menck CFM, Kaina B. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene* 2007; **26** (2):186–197.
7. Ochs K, Kaina B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res.* 2000; **60** (20): 5815-24.

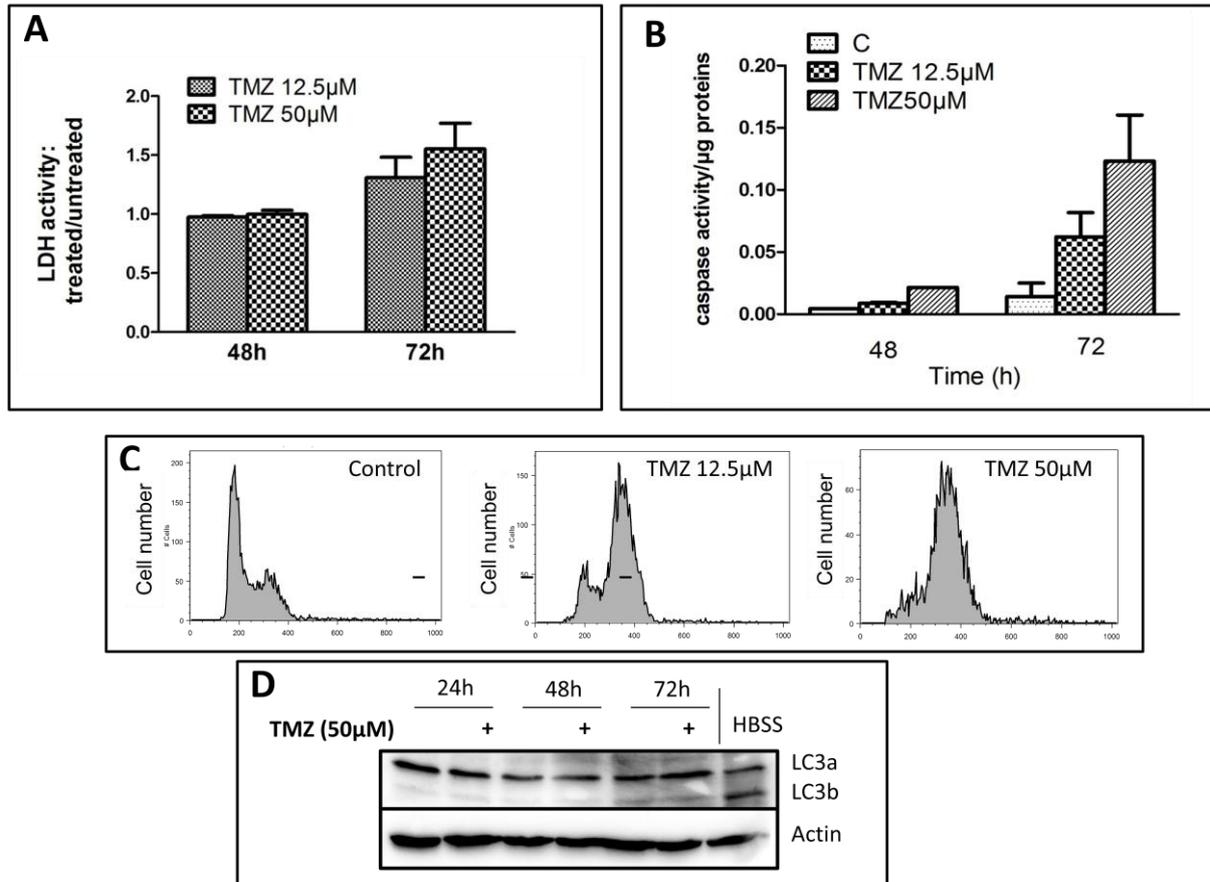
8. Roos W, Baumgartner M, Kaina B. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 2004; **23** (2) : 359-67.
9. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, and Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Diff.* 2004; **11** (4): 448–457.
10. Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? *Autophagy*. 2012 ; **8** (1) :1-3.
11. Hirose Y, Katayama M, Mirzoeva OK, Berger MS, and Pieper RO. Akt Activation Suppresses Chk2-Mediated, Methylating Agent–Induced G2 Arrest and Protects from Temozolomide-Induced Mitotic Catastrophe and Cellular Senescence. *Cancer Res.* 2005; **65** (11): 4861-4869.
12. Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2001; **61**(15): 5843–5849.
13. Shi L, Chen J, Yanga J, Pana T, Zhanga S and Wang Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res.* 2010; **1352**: 255-264.
14. Günther W, Pawlak E, Damasceno R, Arnold H, and AJ Terzis AJ (2003) Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids *Brit. J. Cancer.* 2003; **88** (3): 463-469.
15. Zhang W-B, Wang Z, Shu F, Jin J-h, Liu H-Y, Wang Q-J, and Yang Y. Activation of AMP-activated Protein Kinase by Temozolomide Contributes to Apoptosis in Glioblastoma Cells via p53 Activation and mTORC1 Inhibition. *J. Biol. Chem.* 2010; **285** (52): 40461–40471.
16. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res.* 2004; **10** (11): 3728-36.

17. Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J.* 2010; **29** (3): 515-6.
18. Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, Vallette FM. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007; **12** (5): 887-896.
19. Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev.* 2011; **21** (1):12-20.
20. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 2013; **332**(2): 237-48.
21. Zinkel S, A Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control *Cell Death Diff.* 2006; **13** (8): 1351-1359
22. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* 2005; **435** (7042): 677-681.
23. Cartron PF, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K, Vallette FM. Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2003 ; **23** (13):4701-4712.
24. Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, Modjtahedi N, Kroemer G. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol.* 2008; **445**:29-76.
25. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guilhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etcheverry A, Hamlat A, Loussouarn D, Campion L, Campone M, Vallette FM, Gratas-Rabbia-Ré C. Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol.* 2010; **97** (3) :311-22.
26. Hervouet E, Debien E, Campion L, Charbord J, Menanteau J, Vallette FM, Cartron PF. Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin Cancer Res.* 2009; **15** (10) :3519-29.

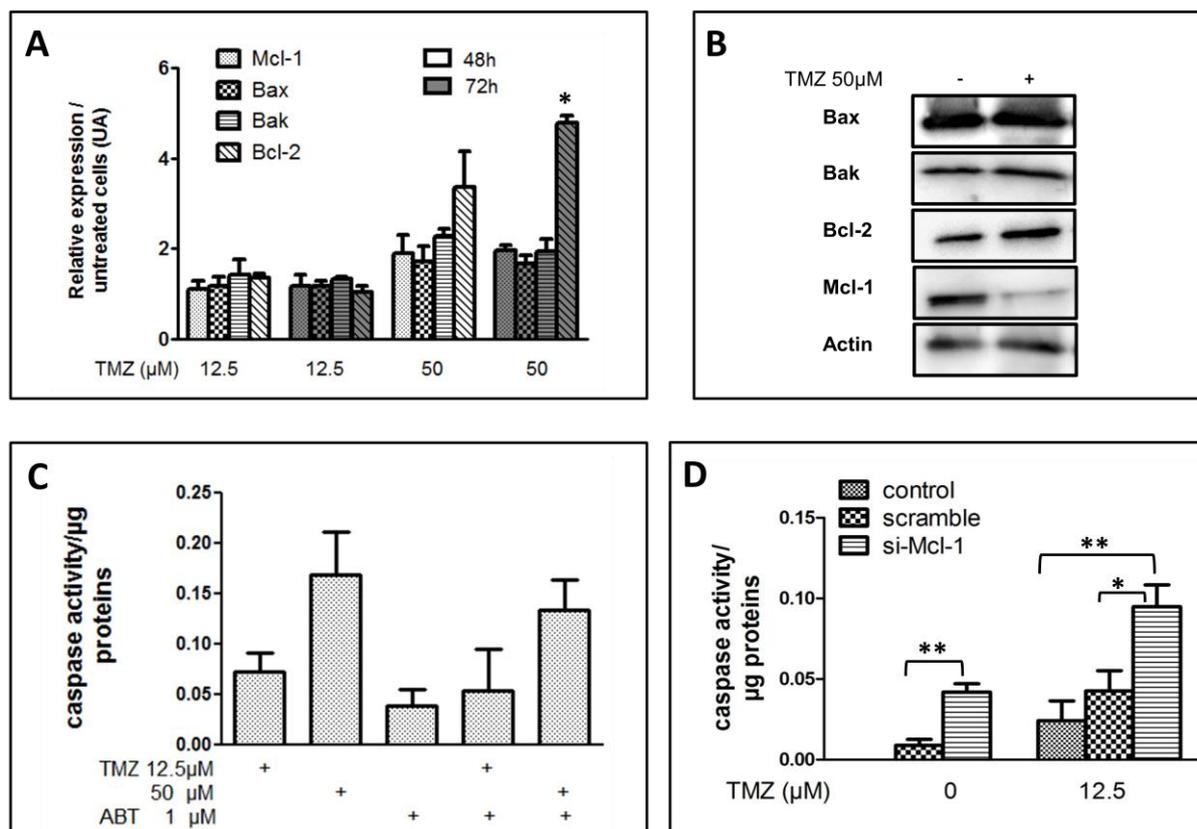
27. Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.* 2010; **1**:e8.
28. von Haefen C, Gillissen B, Hemmati PG, Wendt J, Güner D, Mrozek A, Belka C, Dörken B, Daniel PT. Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 2004; **23 (50)**: 8320–8332.
29. Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, Mürer A, Overkamp T, Gebhardt N, Preissner R, Belka C, Dörken B, Daniel PT. Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J. Cell Biol.* 2010; **188 (6)**:851-62.
30. Wang C, Youle RJ. Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene* 2012; **31(26)**: 3177-3189.
31. Baritaud M, Cabon L, Delavallée L, Galán-Malo P, Gilles ME, Brunelle-Navas MN, Susin SA. AIF-mediated caspase-independent necroptosis requires ATM and DNA-PK-induced histone H2AX Ser139 phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2012; **3**:e390.
32. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;**29**:e45.
33. Asuthkar S, Velpula KK, Chetty C, Gorantla B, Rao JS. Epigenetic regulation of miRNA-211 by MMP-9 governs glioma cell apoptosis, chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncotarget* 2012; **3(11)**:1439-54.
34. Triscott J, Lee C, Hu K, Fotovati A, Berns R, Pambid M, Luk M, Kast RE, Kong E, Toyota E, Yip S, Toyota B, Dunn SE. Disulfiram, a drug widely used to control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide. *Oncotarget.* 2012, **3(10)**:1112-23
35. Shinsato Y, Furukawa T, Yunoue S, Yonezawa H, Minami K, Nishizawa Y, Ikeda R, Kawahara K, Yamamoto M, Hirano H, Tokimura H, Arita K. Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma. *Oncotarget.* 2013 in press.

36. Kast RE, Boockvar JA, Brüning A, Cappello F, Chang WW, Cvek B, Dou QP, Duenas-Gonzalez A, Efferth T, Focosi D, Ghaffari SH, Karpel-Massler G, Ketola K, Khoshnevisan A, Keizman D, Magné N, Marosi C, McDonald K, Muñoz M, Paranjpe A, Pourgholami MH, Sardi I, Sella A, Srivenugopal KS, Tuccori M, Wang W, Wirtz CR, Halatsch ME. A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care. *Oncotarget*. 2013; **4(4)**:502-30.
37. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; **65 (1-2)**: 55-63.
38. Juin P, Pelletier M, Oliver L, Tremblais K, Grégoire M, Meflah K, Vallette FM. Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem*. 1998; **273 (28)**: 17559–17564.
39. Oliver L, Hue E, Priault M, Vallette FM. Basal autophagy decreased during the differentiation of human adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012; **21 (15)**:2779-88.
40. Tripodi D, Quéméner S, Renaudin K, Ferron C, Malard O, Guisle-Marsollier I, Sébille-Rivain V, Verger C, Géraut C, Gratas-Rabbia-Ré C. Gene expression profiling in sinonasal adenocarcinoma. *BMC Med Genomics*. 2009; **2**:65.

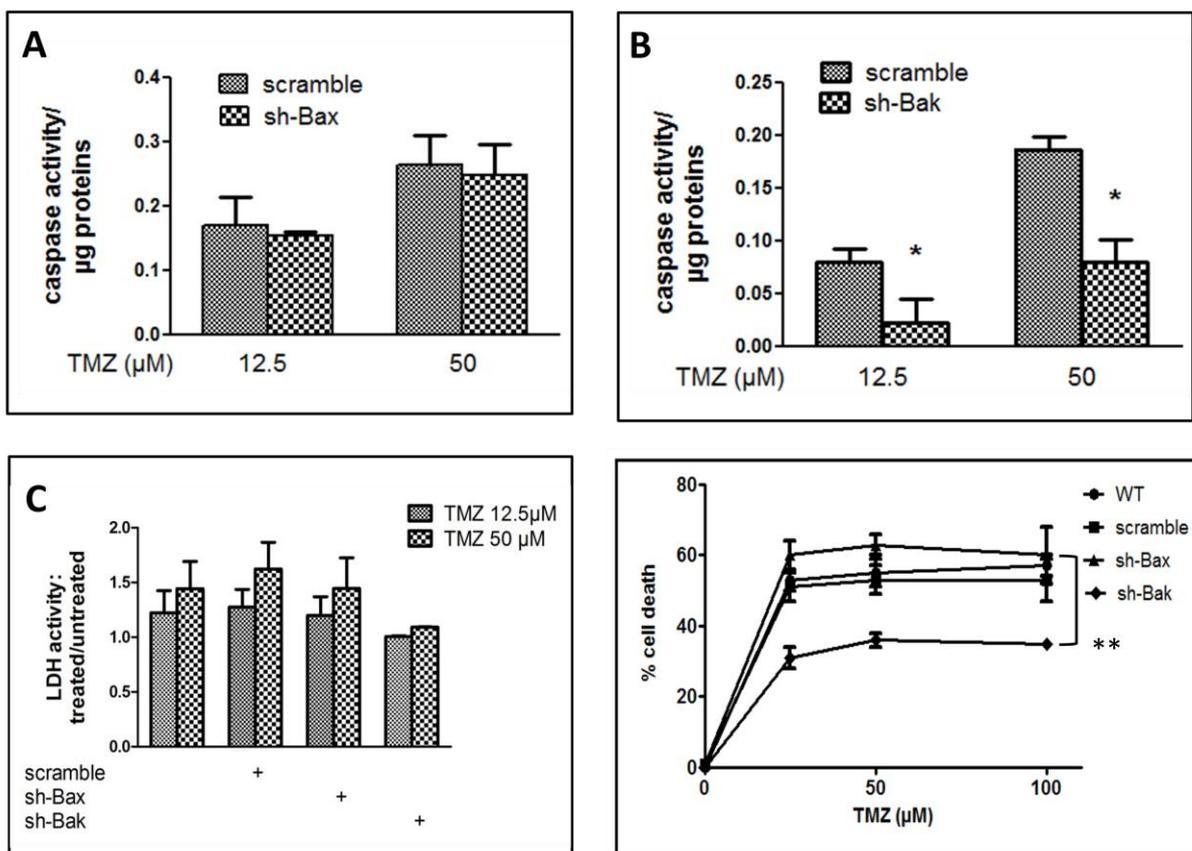
Figures



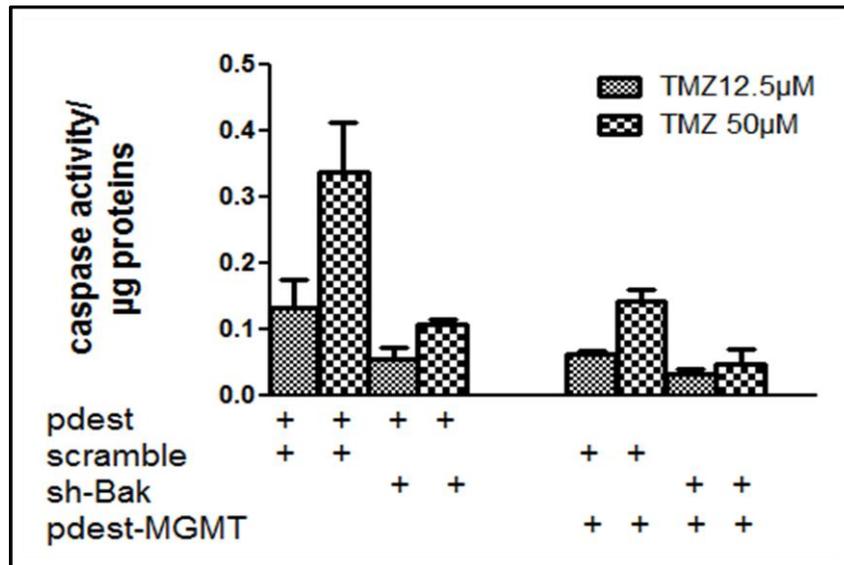
**Figure 23 TMZ induced apoptosis and G2 cell arrest at therapeutic concentrations in U251 cells.** U251 cells were treated with 12.5 µM or 50 µM TMZ. (A) LDH activity was measured in the supernatant at indicated times. Data are expressed as mean +/- SD. (B) DEDvase activity was measured after 48 and 72h TMZ exposure. (C) Cells were stained with iodide propidium and cell cycle analysis was performed at 48h post-TMZ exposure. (D) Western Blot showing no LC3 cleavage in response to TMZ in U251 control cells. EBSS medium was used as positive control of autophagy and both LC3-I and LC3-II are present. Each experiment was performed at least 3 times independently.



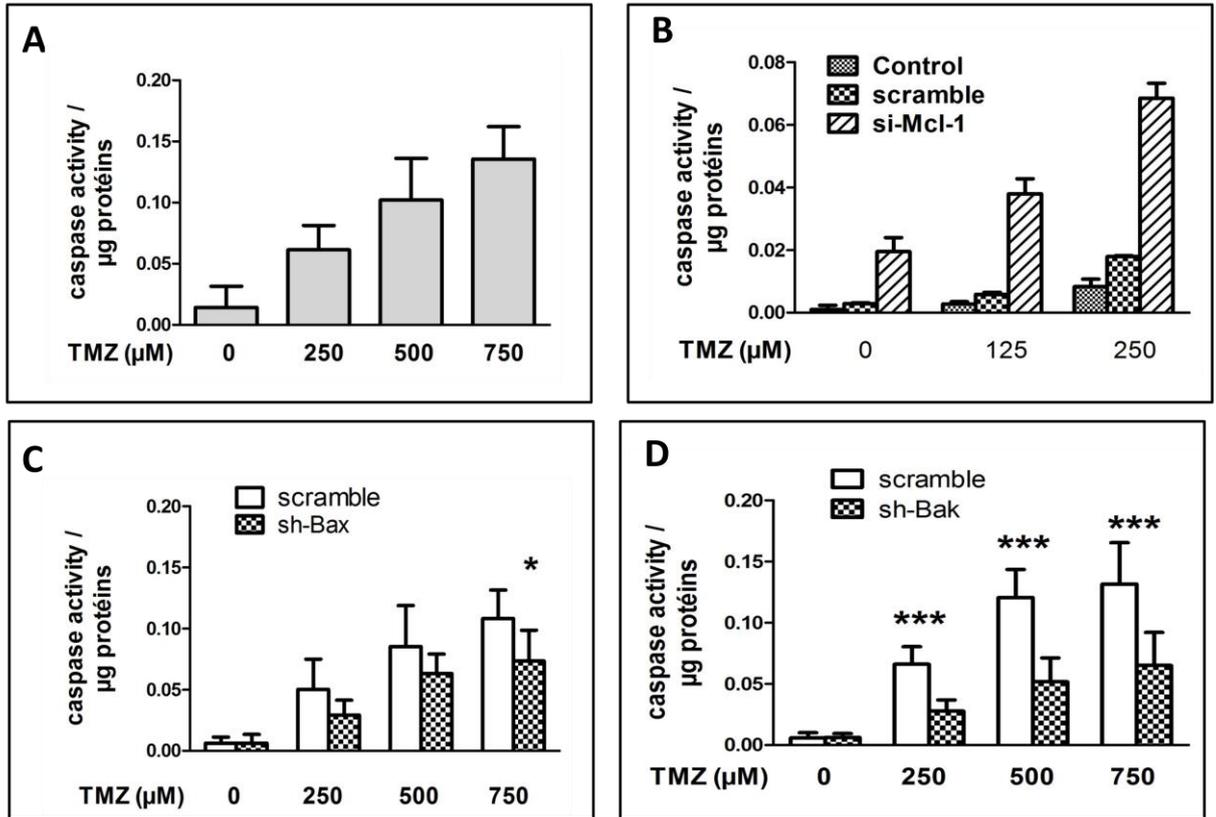
**Figure 24 Influence of TMZ on the expression of key members of the Bcl-2 family.** (A) RNA expression of Mcl-1, Bcl-2, Bax and Bak in U251 cells treated with 12.5 μM and 50 μM TMZ for 48h or 72h was evaluated by qPCR. Data are expressed as mean +/- SD. (B) Immunoblots analyses of Bax, Bak, Bcl-2 and Mcl-1 in U251 treated or not with 50 μM TMZ for 72h. The graph is illustrative of one of three independent experiments. (C) DEVDase activity measured in proteins extracts, 72h post-treatment of cells by TMZ (12.5 or 50 μM) plus or minus ABT 1 μM. (D) DEVDase activity measured in proteins extracts of untreated cells or cells transfected with si-RNA, scramble or directed against Mcl-1, and treated for 48h with 12.5 μM TMZ. Data are expressed as mean +/- SD, n=3.



**Figure 25** TMZ induced apoptosis in U251 cells via the pro-apoptotic protein Bak. (A) DEVDase activity measured in U251 cells transduced with sh-scramble or sh-Bax and treated with 12.5 or 50 µM TMZ for 72h. (B) DEVDase activity measured in U251 cells transduced with sh-scramble or sh-Bak and treated with 12.5 or 50 µM TMZ for 72h. (C) Measure of the LDH activity in the supernatant of U251 transduced with scrambled sh, shBak or sh Bax treated with TMZ. (D) Data are expressed as mean +/- SD, n=3. (D) MTT assay with U251 cells transduced with scramble-sh, shBak or sh-Bax, and treated with 25, 50 or 100 µM TMZ for 72h. Data are expressed as mean +/- SD, n=3.



**Figure 26 TMZ induced apoptosis in U251-MGMT positive cells via Bak protein.** U251 cells were transfected with a control plasmid pDEST 12.2 or a vector pDEST-MGMT in presence or in absence of sh-Bak. DEDvase activity was measured in proteins extracts after 72 h exposure to 12.5 or 50 µM TMZ. Results are expressed as mean +/- SD, n=3.



**Figure 27** TMZ induced apoptosis in LN18 is also Mcl-1 and Bak dependent. (A) DEDvase activity measured after 72h TMZ exposure at 250, 500 or 750  $\mu\text{M}$ . Each experiment was performed at least 3 times independently. (B) DEVDase activity measured in proteins extracts of untreated cells or cells transfected with si-RNA, scramble or directed against Mcl-1, and treated for 72h with 125 or 250  $\mu\text{M}$  TMZ. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n=3. (C) DEVDase activity measured in LN18 cells treated with sh-scramble, sh-Bak or sh-Bax and treated or not with 250, 500 and 750  $\mu\text{M}$  TMZ for 72h.

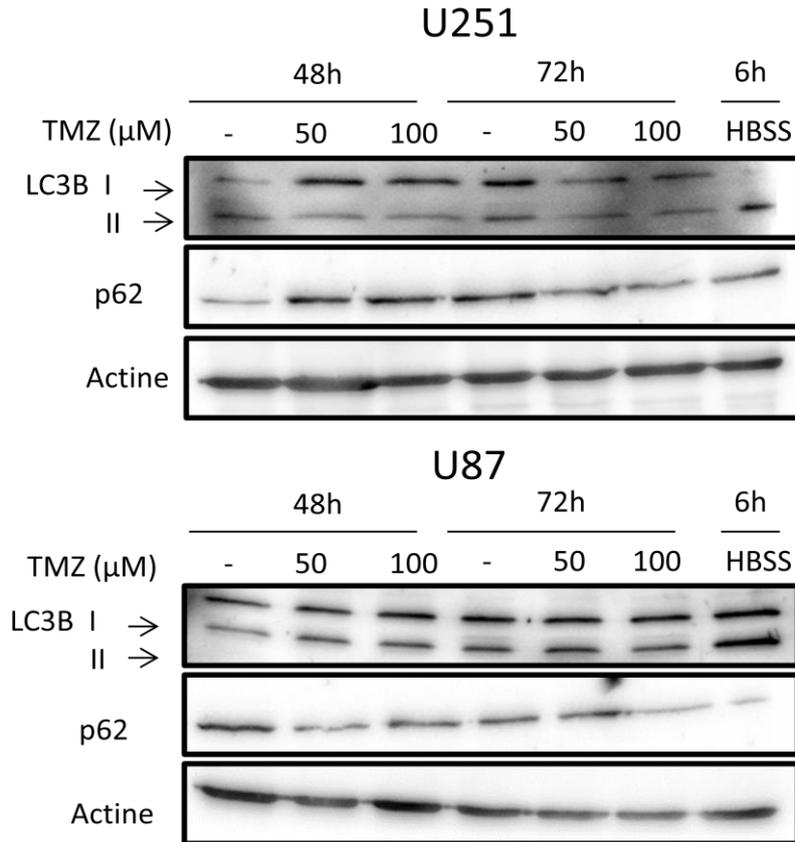
## 2 L'autophagie est-elle impliquée ?

Plusieurs études rapportent que le TMZ est un agent pro-autophagique. L'équipe de Christmann et Kaina ont récemment suggéré que l'induction de l'autophagie par le TMZ est une étape précoce dont dépend l'activation plus tardive de l'apoptose. Ces deux phénomènes seraient donc séquentiels et interdépendants. Dans le papier présenté en première partie, nous concluons qu'à faibles doses le TMZ n'induit pas d'autophagie dans nos cellules. Ci-après se sont présentés les résultats qui ont amenés à cette conclusion.

L'autophagie est un processus catabolique conservé au cours de l'évolution qui permet à la cellule de séquestrer le contenu cytoplasmique (notamment les protéines) à l'intérieur de vacuoles à bi-couche lipidique appelées autophagosomes. Ces autophagosomes sont ensuite délivrés aux lysosomes pour que leur contenu puisse être dégradé et les différentes molécules réutilisées. L'autophagie fonctionne en tant que processus de survie dans les cellules privées de nutriments. Une activation extensive de l'autophagie est communément observée dans des cellules mourantes ce qui la classe en tant que mort cellulaire de type II. À l'inverse de l'apoptose, la détection et la quantification de l'autophagie demeurent compliquées, c'est pourquoi nous avons employé différents marqueurs.

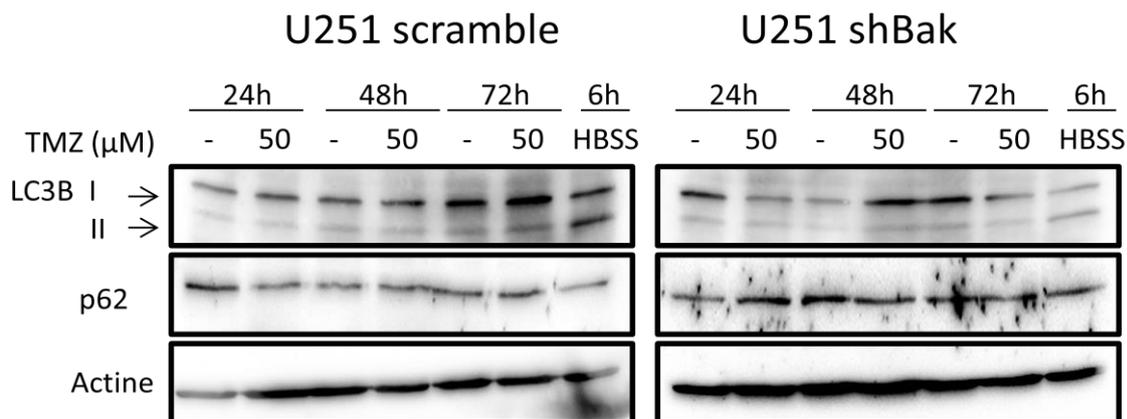
### 2.1 Clivage de LC3B et perte de p62

Le clivage de LC3B-I en LC3B-II permet la formation de l'autophagosome et est donc un indicateur de l'initiation de l'autophagie. La protéine p62/SQSTM1 permet d'agrèger les protéines ubiquitinylées aux autophagosomes en vue de leur dégradation et par conséquent diminue au fur et à mesure que l'autophagie est activée. Nous avons analysé l'expression de ces deux protéines dans les lignées U251 et U87 traitées à 50 et 100 $\mu$ M de TMZ (Figure 28). La lignée U251 ne montre pas de clivage de LC3B à 48 ou 72h. On peut noter une légère augmentation de la forme totale de LC3B à 48h en présence de TMZ. La lignée U87 possède un clivage basal de LC3B plus important que la lignée U251. Il n'y a cependant pas d'augmentation de la forme clivée après traitement TMZ. La variation de p62/SQSTM1 dans la lignée U251 n'est pas significative et nous n'avons pas pu conclure à une activité autophagique du TMZ. On distingue cependant une légère diminution de p62/SQSTM1 dans la lignée U87 à 72h à partir de 100 $\mu$ M. Ces lignées ne sont pas défectives pour l'autophagie puisque une augmentation de LC3B-II est visible lorsqu'elles sont soumises à un milieu HBSS sans nutriments pendant 6h.



**Figure 28 Induction de l'autophagie par le TMZ dans les lignées U251 et U87.** L'expression de LC3B et p62 a été analysée dans les lignées U251 et U87 traitées au TMZ pendant 48 et 72h. L'autophagie a été induite dans les lignées en les laissant 6h dans du milieu sans nutriment HBSS.

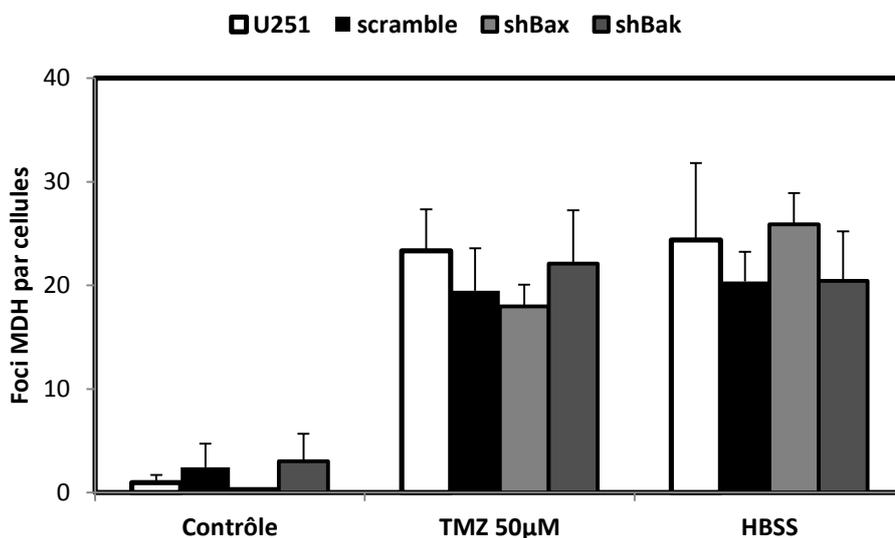
La protéine pro-apoptotique effectrice Bak est essentielle à l'apoptose induite par le TMZ dans la lignée U251 (Gratas et al. 2013). Privées de Bak, une partie des cellules U251 meurent tout de même et nous avons voulu savoir si cette mort pouvait être de nature autophagique. Comme le montre la Figure 29, l'extinction de Bak n'a aucun effet sur le clivage de LC3B ou sur p62 après traitement au TMZ. Il en est de même pour les cellules U251-shBax (non montré).



**Figure 29** Effets de l'extinction de Bak sur le clivage de LC3B et p62.

## 2.2 Marquage des vésicules autophagiques

Le clivage de LC3B est un marqueur versatile dont l'interprétation est difficile. Nous avons marqué spécifiquement les lipides formant les vésicules autophagiques avec du monodansylpentane (MDH) *in vivo* par microscopie à fluorescence. Une forte augmentation des vésicules lipidiques est observée dans les cellules U251 après traitement au TMZ. Cette augmentation n'est pas affectée par l'invalidation de Bax ou de Bak (Figure 30).



**Figure 30** Quantification des vésicules lipidiques. Les vésicules lipidiques sont quantifiées par un marquage MDH dans les cellules U251 invalidées pour Bax ou Bak 72h après traitement TMZ (50 μM).

Le TMZ n'induit pas le clivage de LC3B ni la dégradation de p62 dans la lignée U251 qu'elle soit invalidée ou non pour Bak. Cependant il existe bien une formation de vésicules lipidiques dans les cellules U251 traitées au TMZ.

La mort induite par le TMZ dans la lignée U251 passe principalement par l'activation des caspases de manière dépendante à l'axe Mcl-1/Bak. La deuxième partie de ces résultats s'intéressera aux mécanismes de résistances au TMZ.

## B. LA RESISTANCE AU TMZ

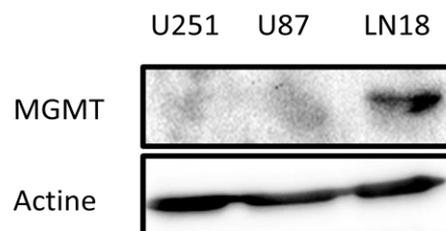
Il est maintenant communément admis que le principal facteur de résistance au TMZ est l'enzyme de réparation MGMT. L'EGFR, fortement surexprimé dans les GBMs primaires, est aussi associé à la résistance au traitement (Murat et al., 2008). Nous avons donc regardé l'implication de ces deux protéines dans la réponse au TMZ dans des lignées de GBMs primaires.

### 1 Réponse au TMZ et phénotype

Nous disposons de trois lignées de GBMs primaires, les lignées U251, LN18 et U87 qui présentent des altérations génétiques différentes (Tableau 2). Le profil de méthylation du promoteur de *MGMT* est couramment utilisé en clinique car il est prédictif de la réponse au TMZ. Parmi nos trois lignées, LN18 est la seule ayant un promoteur non méthylé qui se traduit par une expression de la protéine (Figure 31).

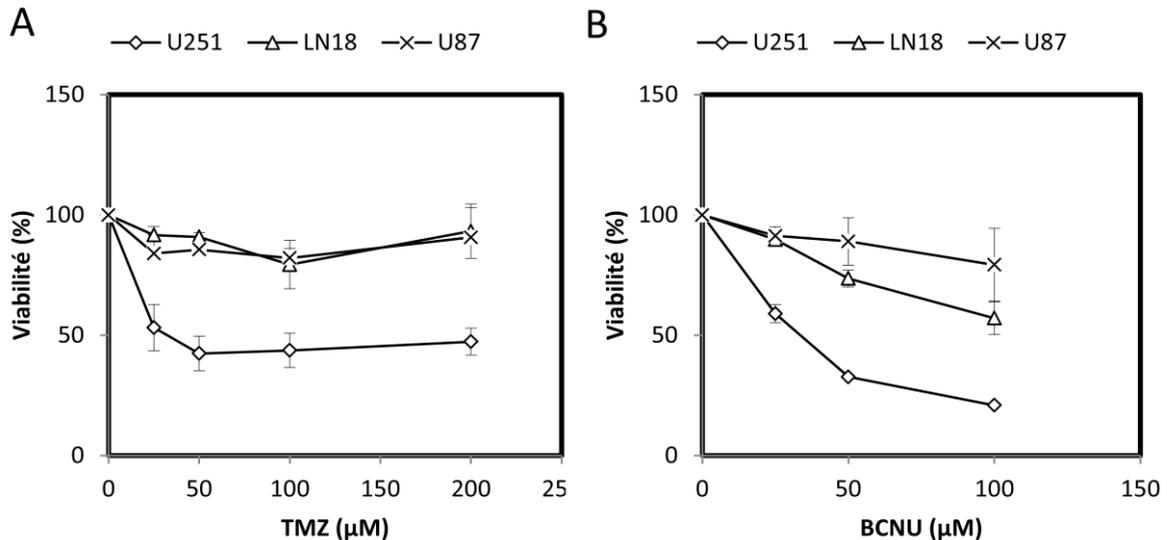
Lignée	Promoteur MGMT	Statut p53	Statut PTEN
U251	Méthylé	Muté	Muté
U87	Méthylé	Sauvage	Muté
LN18	Non Méthylé	Muté	Sauvage

**Tableau 2 Principales altération génétiques des lignées U251 LN18 et U87**



**Figure 31 Expression de l'enzyme MGMT dans les lignées U251 LN18 et U87.**  
(Western blot)

Nous avons traité ces lignées avec deux agents alkylants, le TMZ et le BCNU (Figure 32A, B). La lignée LN18 exprimant la MGMT est résistante au TMZ et au BCNU. Cependant parmi les deux autres lignées sans MGMT, nous pouvons voir que la lignée U251 est sensible aux deux agents alkylants tandis que la lignée U87 est résistante. La mutation de la p53 ne confère pas de résistance à la lignée U251 et inversement la lignée U87 est résistante malgré une p53 sauvage.



**Figure 32 Réponse aux agents alkylants.** La viabilité des lignées U251 LN18 et U87 a été mesurée par test MTT 72h après un traitement (A) au TMZ ou (B) au BCNU

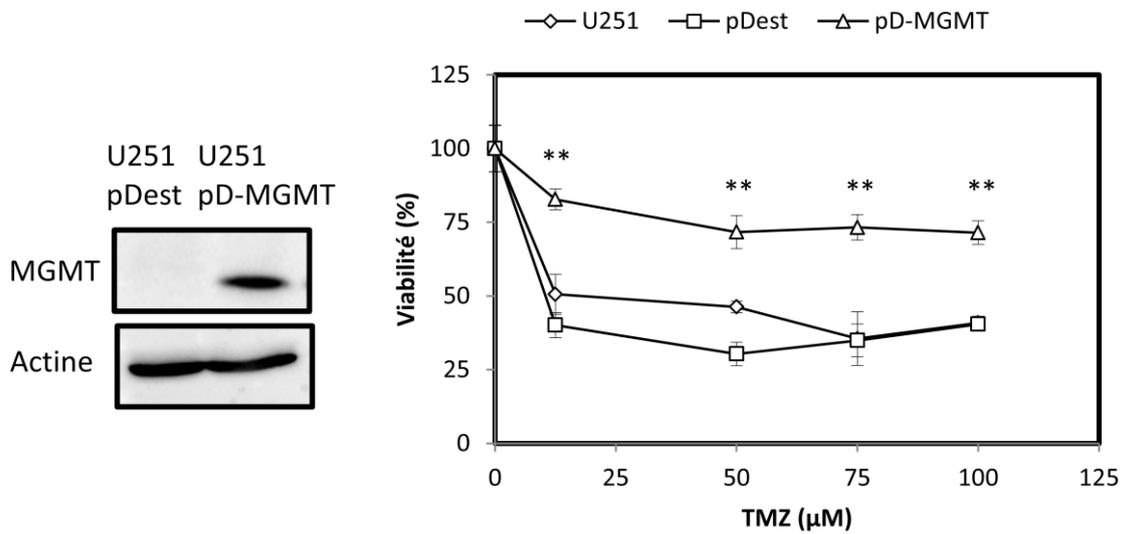
## 2 MGMT acteur principal de la résistance au TMZ

Les agents alkylants induisent leur cytotoxicité par l'ajout de groupements alkyls sur les bases de l'ADN. La cytotoxicité du TMZ passe par l'ajout de groupements méthyls en position N<sup>3</sup> des adénines, réparés par excision de base ou de groupements méthyls en position O<sup>6</sup> des guanines réparés par l'enzyme MGMT. L'induction de l'expression de MGMT dans la lignée U251 sensible permet donc de juger de son implication dans la résistance au TMZ.

### 2.1 Surexpression de la MGMT

La lignée U251-pD-MGMT est obtenue par transfection avec le plasmide pDest-MGMT. L'expression de MGMT confère une résistance au TMZ comparable à celle de la

lignée LN18 (Figure 33). Cette résistance s'accompagne d'une abolition de l'activité caspase dans la lignée U251-pD-MGMT.

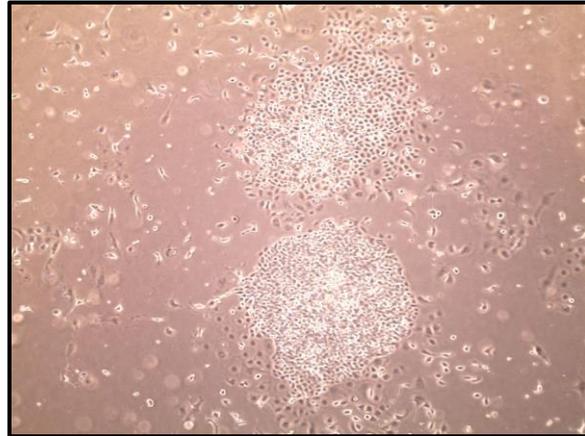


**Figure 33 Induction de la MGMT dans la lignée U251.** (A) Expression stable de la MGMT dans la lignée U251. (B) Test de viabilité par MTT 72h après traitement TMZ.

L'expression de l'enzyme MGMT est suffisante pour abolir la mort par apoptose induite par le TMZ dans la lignée U251, ce qui suggère que l'essentiel de la cytotoxicité du TMZ passe par les lésions O<sup>6</sup>-méthyl-guanines. Le promoteur du gène *MGMT* étant méthylé dans la lignée U251, celle-ci n'exprime pas la protéine. Chez les patients, les GBMs acquièrent au cours du temps une résistance au traitement qui amène à une rechute inévitable. Nous avons voulu étudier les mécanismes d'acquisition de la résistance au TMZ dans la lignée U251. Ainsi nous avons étudié les conséquences d'un traitement prolongé sur l'expression de l'enzyme MGMT dans cette lignée.

## 2.2 Acquisition d'une résistance au TMZ dans la lignée U251

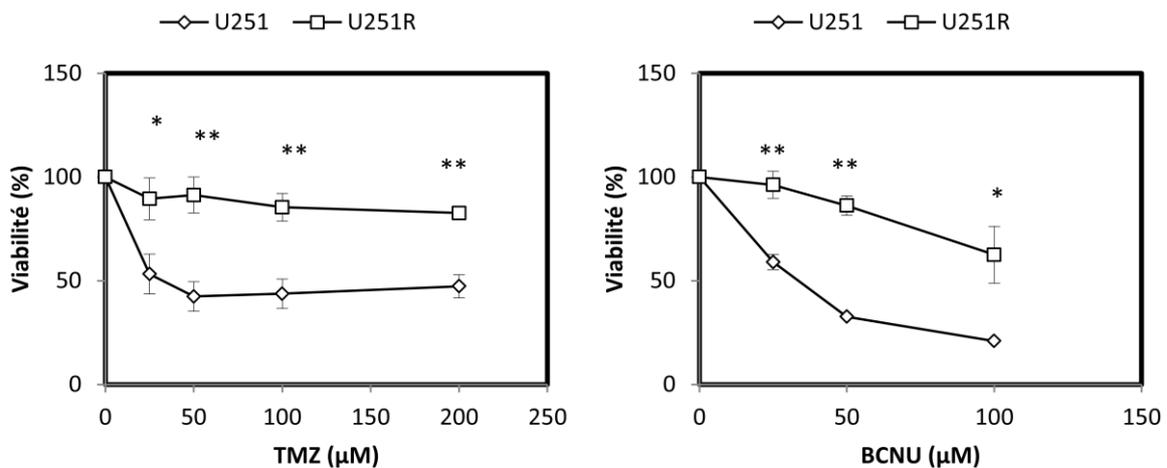
Une lignée résistante au TMZ, U251R, a été obtenue en traitant la lignée U251 avec 25μM de TMZ pendant 12 jours en renouvelant la dose tous les 3 jours. À partir de 3 jours, la plupart des cellules meurent par apoptose. Ensuite les cellules survivantes recommencent à proliférer et forment des colonies (Figure 34). Après 12 jours les cellules sont trypsinisées et remises en condition normales de culture en maintenant la pression de sélection par le TMZ.



**Figure 34** Colonies formées par les cellules U251 soumises à un traitement prolongé au TMZ.

### 2.2.1 Résistance aux agents alkylants

La lignée U251R montre une résistance au TMZ et au BCNU comparable aux lignées U87 et LN18 (Figure 8)

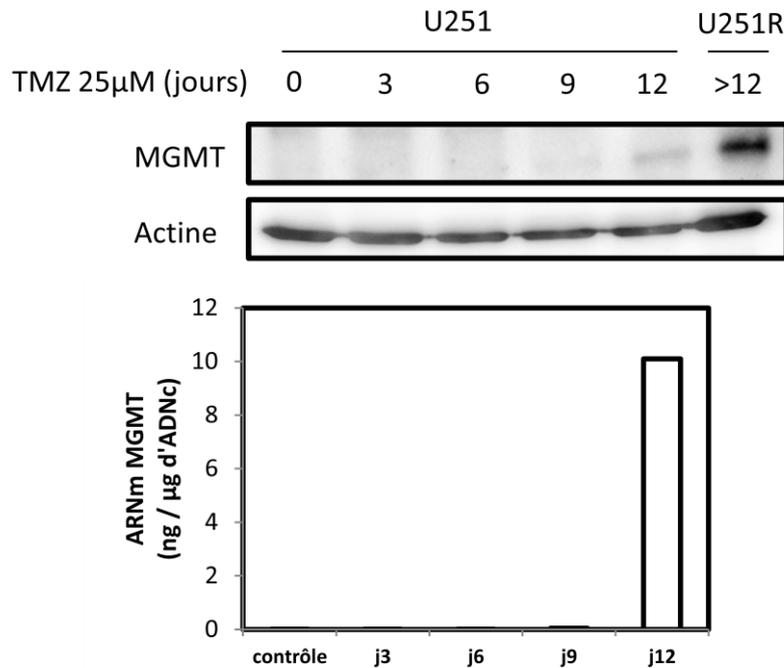


**Figure 35** Résistance aux agents alkylants de la lignée U251R. Test de viabilité par MTT dans la lignée U251R en comparaison avec la lignée d'origine 72h après traitement TMZ.

### 2.2.2 Réexpression de la MGMT

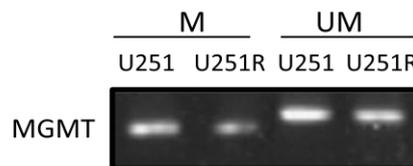
Nous avons contrôlé l'expression de l'ARNm et de la protéine MGMT au cours de l'acquisition de la résistance dans la lignée U251. Comme le montre la figure 36, l'ARNm de

la MGMT est détecté à partir de 12 jours et la protéine peu de temps après. Cette acquisition de MGMT est conservée dans les cellules U251R même lorsque l'on arrête totalement la pression de sélection par le TMZ.



**Figure 36 Expression de MGMT par les cellules U251R.** Western blot et QPCR.

Nous avons donc analysé par bisulfitation de l'ADN et PCR semi-quantitative (Karayan-Tapon, 2010), la méthylation des CpG sur le promoteur du gène *MGMT*. La zone étudiée correspond à celle utilisée en clinique et décrite par Esteller *et al.*. Dans la lignée U251R, cette séquence du promoteur reste fortement méthylée (74%) et il n'y a pas de différence significative du degré de méthylation par rapport à la lignée U251 d'origine (77%) (Figure 37).

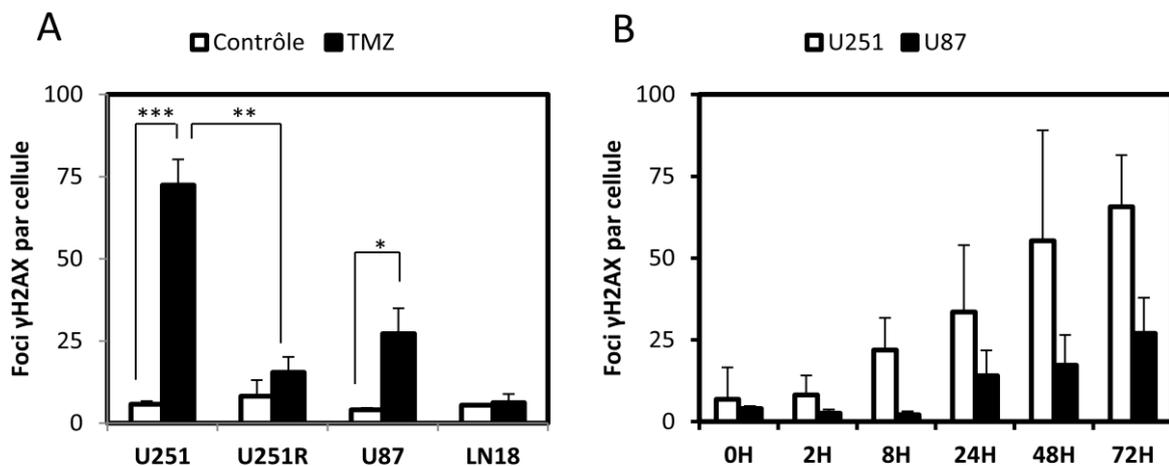


**Figure 37 Méthylation de *MGMT*.**

La résistance au TMZ de la lignée U251R s'appuie sur une réexpression de la MGMT mais qui n'est pas corrélée avec le statut de méthylation de son promoteur. Nous avons regardé les conséquences de cette réexpression sur les dommages à l'ADN provoqués par le TMZ.

### 2.3 MGMT et dommages à l'ADN

Les méthylations en position O6 des guanines causées par le TMZ induisent, si elles ne sont pas éliminées, des cassures doubles brins de l'ADN. Les cassures doubles brins sont signalées dans la cellule par l'activation de H2AX. Grâce au marquage par immunocytochimie de  $\gamma$ -H2AX, la forme active de H2AX, nous avons évalué la quantité de dommages induits par le TMZ (Figure 38A). À 72h, la lignée U251 est la seule à présenter de la mort et une activation des caspases, c'est aussi la lignée présentant le plus de cassures doubles brins. Les lignées résistantes LN18 et U251R qui expriment MGMT, ne présentent pas ou peu de cassures. Bien que n'ayant aucun effet sur sa viabilité, le TMZ engendre tout de même des cassures doubles brins dans la lignée U87.



**Figure 38 Foci  $\gamma$ H2AX en réponse au TMZ.** (A) Quantification des foci H2AX par immunocytochimie après 72h de traitement au TMZ 50 $\mu$ M. (B) Cinétique d'apparition des foci H2AX Après traitement au TMZ 50 $\mu$ M.

Comparativement à la lignée U251 d'origine l'expression de MGMT dans la lignée U251R est suffisante pour annuler complètement les cassures doubles brins induites par le TMZ. L'activation de  $\gamma$ -H2AX apparait dans la lignée U251 dès 8h après exposition au TMZ et les foci s'accroissent jusqu'à l'induction de la mort par apoptose à 72h (Figure 38B). La

lignée U87 présente le même schéma d'accumulation que les U251, avec des dommages visibles à partir de 24h. À dose égale de TMZ, la lignée U87 cumule moins de cassures doubles brin que la lignée U251 et ces cassures n'affectent pas la viabilité de la lignée U87.

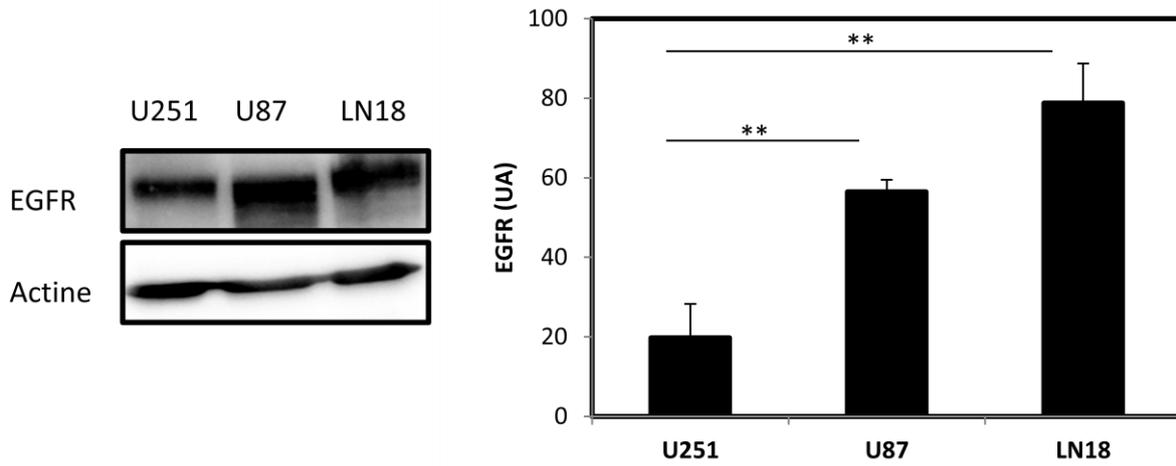
L'acquisition de la résistance dans la lignée U251R s'appuie sur une réexpression de la MGMT pour réparer les dommages causés par le TMZ. Cependant la MGMT n'apparaît que tardivement dans les cellules U251 sous traitement prolongé, au moins après 6 jours. De plus, la lignée U87 résiste au TMZ par un mécanisme inconnu n'impliquant pas la MGMT. Parce qu'il est lié à la résistance au TMZ et qu'il est fortement impliqué dans la tumorigenèse des GBMs primaire, nous nous sommes intéressés au récepteur à l'EGF et à ses ligands dans la réponse au TMZ.

### **3 EGFR et ses ligands dans la résistance au TMZ**

Le récepteur à l'EGF (EGFR) est fortement impliqué dans l'oncogenèse et la progression des GBMs primaires et est surexprimé dans les lignées résistantes au TMZ comparativement aux lignées sensibles. Il est donc potentiellement impliqué dans la résistance au traitement.

#### **3.1 Expression d'EGFR dans les lignées**

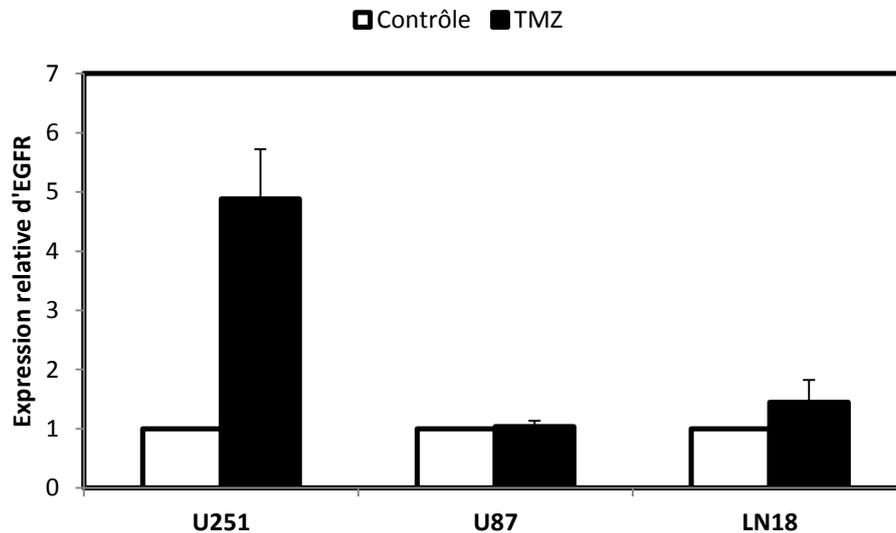
Nous avons regardé le niveau d'expression de l'EGFR au niveau de l'ARN et de la protéine dans nos trois lignées (Figure 39). Les lignées U87 et LN18 expriment respectivement 3 et 5 fois plus EGFR que la lignée U251 qui est la lignée sensible au TMZ.



**Figure 39** Expression d'EGFR. Western blot et QPCR.

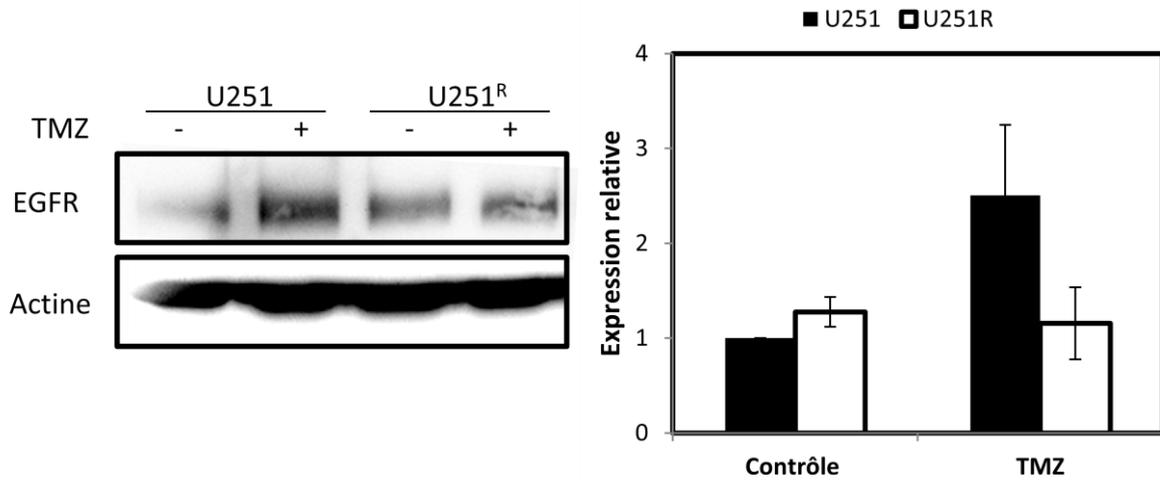
### 3.2 Expression d'EGFR et traitement TMZ

Nous avons regardé l'influence du TMZ sur l'expression de l'ARNm du récepteur à l'EGF dans nos lignées par RT-QPCR (Figure 40). Le TMZ induit une surexpression de l'EGFR uniquement dans la lignée U251. Il n'y a pas de variation dans les lignées U87 et LN18.



**Figure 40** Expression de l'ARNm d'EGFR en réponse au TMZ. Comparaison du niveau d'ARNm d'EGFR des cellules traitées 72h au TMZ 50 $\mu$ M avec les cellules contrôle non traitées.

L'expérience a été renouvelée avec la lignée U251R. La lignée U251R possède le même niveau d'EGFR que la lignée U251 d'origine. Cependant le TMZ n'augmente pas le niveau d'EGFR dans la lignée U251R (Figure 41).

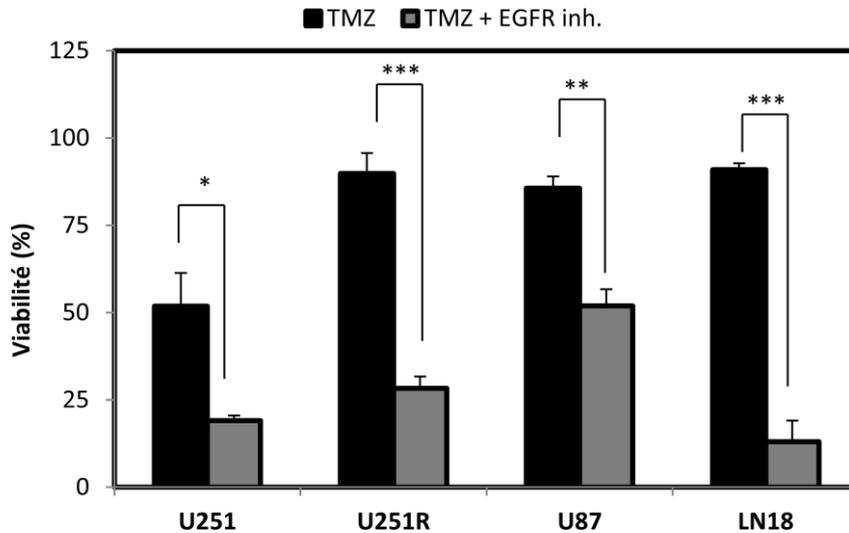


**Figure 41 Expression d'EGFR dans les U251R.** Western blot et QPCR, 72h après traitement TMZ 25 $\mu$ M.

EGFR est exprimé dans toutes nos lignées et les deux lignées résistantes LN18 et U87 en expriment plus que la lignée U251 sensible. Cependant le niveau d'EGFR n'est pas augmenté dans la lignée U251R. Nous avons voulu savoir si une inhibition de l'EGFR pouvait potentialiser les effets du TMZ indépendamment du statut MGMT des lignées.

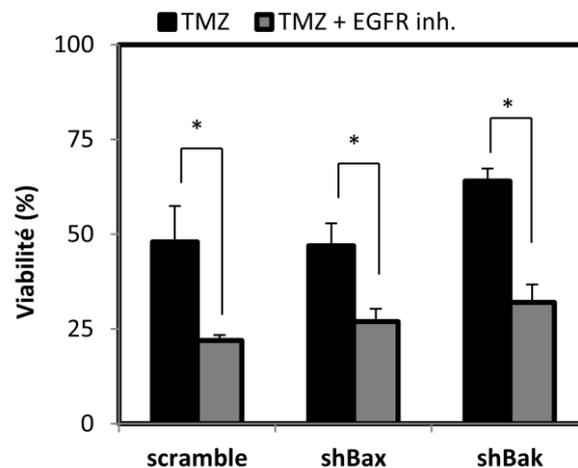
### 3.3 Réponse aux inhibiteurs d'EGFR

Les lignées ont été cotraitées avec 50 $\mu$ M de TMZ et 10 $\mu$ M d'EGFR inhibiteur, un inhibiteur compétitif du site de fixation de l'ATP sur le récepteur. Ce mécanisme d'action est similaire à l'erlotinib utilisé en clinique. De manière intéressante cet inhibiteur augmente considérablement la mortalité dans toutes nos lignées et ce de manière indépendante du statut MGMT et du niveau d'expression de l'EGFR (Figure 42).



**Figure 42 Inhibition d'EGFR en combinaison avec le TMZ.** La viabilité des cellules a été mesurée à 72h en fonction du contrôle non traité par MTT.

De plus la mort induite par l'inhibition d'EGFR est indépendante de Bax ou de Bak (Figure 43), contrairement au TMZ qui induit une apoptose dépendante de Bak.



**Figure 43 Inhibition d'EGFR en fonction du statut Bax et Bak dans la lignée U251.** La viabilité des cellules a été mesurée par MTT à 72h après un traitement TMZ de 50µM par rapport au contrôle non traité.

Ces résultats sont en accord avec la littérature qui rapporte une efficacité globale des inhibiteurs d'EGFR in vitro. Les inhibiteurs d'EGFR ont cependant montré peu d'efficacité dans les GBMs en clinique. Une surexpression des ligands d'EGFR contribue à la

dérégulation de la signalisation du récepteur mais aussi à la résistance aux inhibiteurs et à la chimiothérapie. Ces derniers sont peu étudiés dans le GBM, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à leur expression et à leur rôle putatif dans la réponse au traitement.

### 3.4 Expression des ligands d'EGFR

La figure 44 présente le niveau d'expression basal de l'EGF, de l'épiréguline (REG), du TGF- $\alpha$  et du HBEGF dans les lignées U251, U87 et LN18. À part la lignée U251 qui n'exprime pas d'épiréguline et faiblement le HBEGF, les quatre ligands sont retrouvés dans les lignées. L'EGF est le ligand le plus faiblement exprimé notamment dans les lignée U87 et LN18.

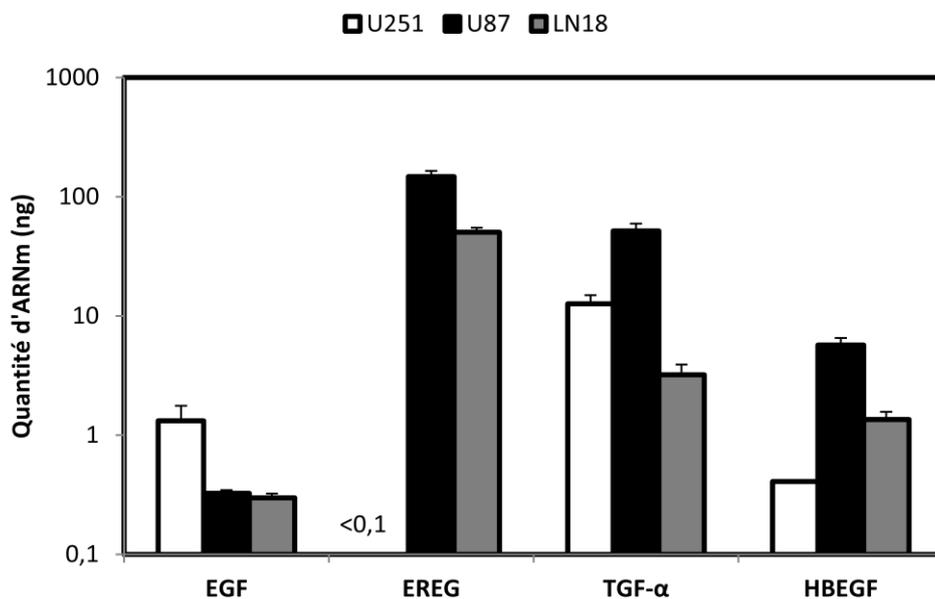
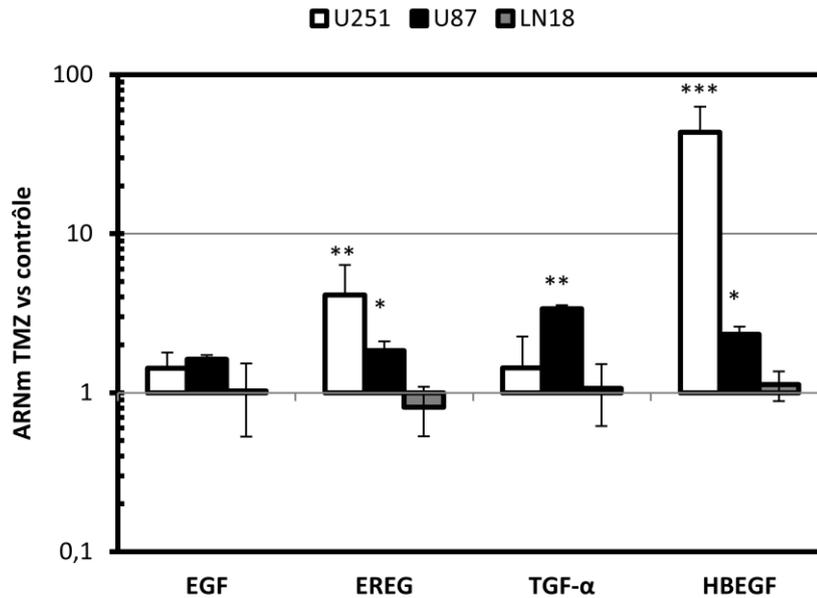


Figure 44 Niveau d'ARNm des ligands d'EGFR.

### 3.5 Expression des ligands d'EGFR en réponse au TMZ

La figure 45 montre les variations de l'expression de ces ligands après traitement TMZ de 50 $\mu$ M dans les trois lignées. On note une surexpression significative du HBEGF dans la lignée U251 (45 fois) en comparaison avec l'épiréguline qui augmente de quatre fois tandis que l'expression de l'EGF et le TGF- $\alpha$  ne change pas. Dans la lignée U87, le HBEGF et le TGF- $\alpha$  augmentent respectivement de 3,5 et 2,5 fois, tandis que l'EGF et l'épiréguline restent stables. La lignée LN18 ne montre aucun changement dans l'expression de ces ligands.



**Figure 45 Expression des ligands d'EGFR en réponse au TMZ.** Les lignées U251, U87 et LN18 ont été traitées 72h au TMZ 50 $\mu$ M et le niveau d'expression a été analysé par QPCR en comparaison avec le contrôle non traité.

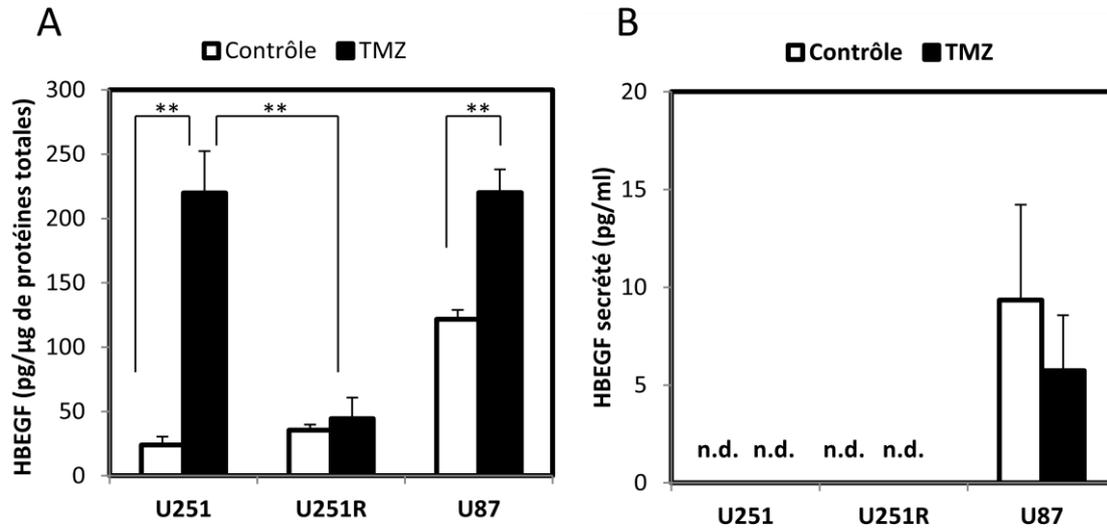
Il a déjà été montré que la surexpression du HBEGF est associée à la réponse à la chimiothérapie (Wang et al., 2007). De plus, la lignée U87 dont la résistance au TMZ n'a pas d'explication mécanistique claire est aussi la lignée qui exprime le plus de HBEGF. Ces résultats nous ont orientés vers le HBEGF en tant qu'acteur potentiel de la résistance au TMZ. La majeure partie de nos travaux présentés ci-après visent donc à découvrir les causes et les conséquences de la surexpression du HBEGF en réponse au TMZ en particulier dans la lignée U251.

## C. ROLE DE L'INDUCTION DU HBEGF PAR LE TMZ

### 1 Quantification du HBEGF

#### 1.1 HBEGF secrété et total

Le proHBEGF est exprimé à la membrane cellulaire. Son clivage permet la libération du HBEGF soluble dans le milieu et l'activation auto- ou paracrine d'EGFR. Le HBEGF secrété dans le surnageant par les cellules U251, U251R et U87 a été dosé par ELISA (Figure 46B). Une faible quantité de HBEGF est retrouvée dans la lignée U87 et aucun HBEGF n'est détecté dans le surnageant des lignées U251 et U251R. Le TMZ n'a aucun effet sur la sécrétion du HBEGF dans les trois lignées. Le dosage par ELISA a été renouvelé sur des extractions de protéines totales (Figure 46A). Le niveau de HBEGF intracellulaire ainsi mesuré corrèle avec les résultats obtenus par QPCR. La lignée U251 présente un niveau basal de HBEGF très faible mais surexprime très fortement la protéine en réponse au TMZ (50 $\mu$ M) 72h après traitement. La lignée U87 a un niveau basal important de HBEGF et cette quantité double en réponse au TMZ. Au contraire, la lignée U251R ne présente aucune surexpression du HBEGF en réponse au TMZ. Son niveau basal est cependant légèrement supérieur à la lignée U251 d'origine.

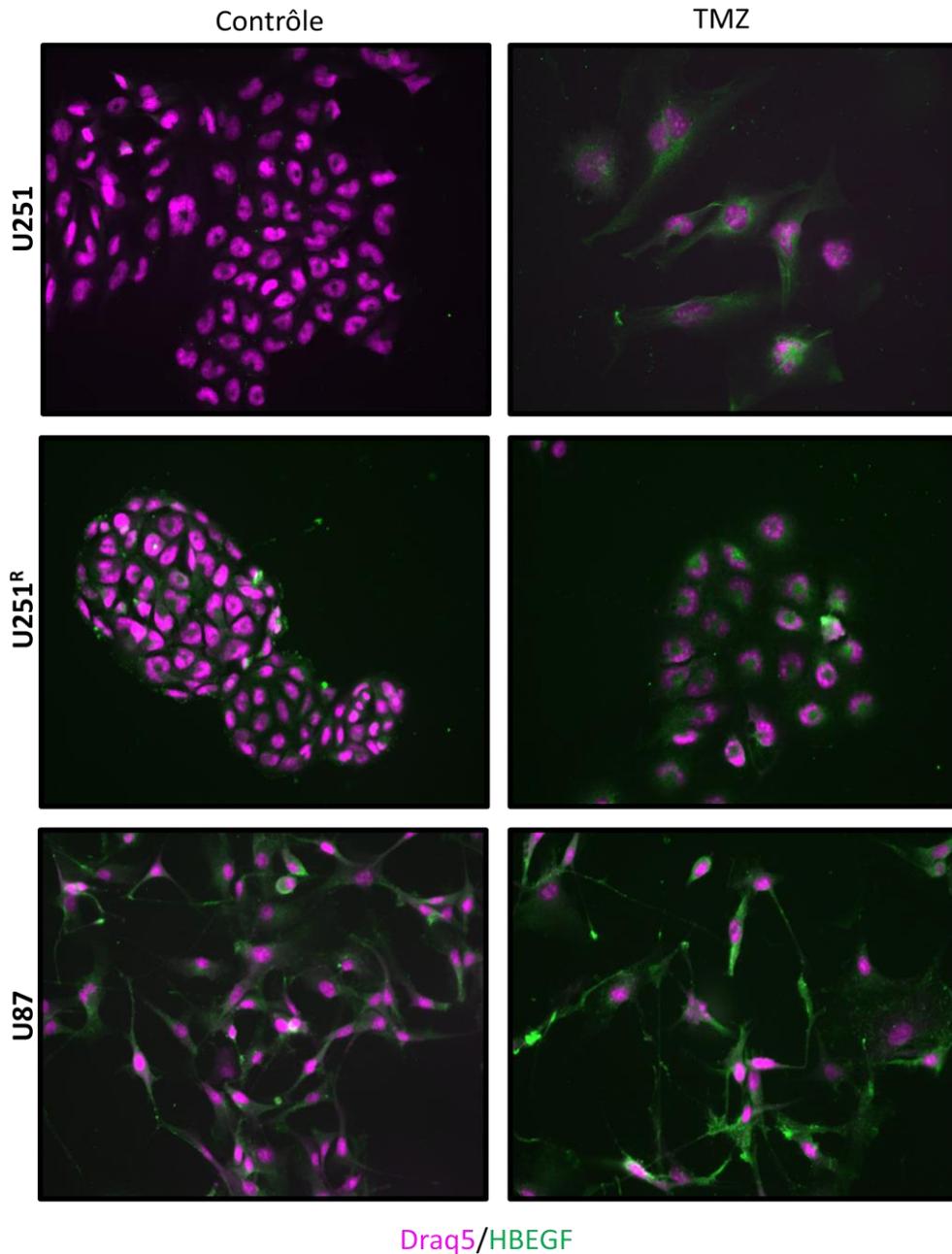


**Figure 46 Quantification du HBEGF.** (A) Quantification du HBEGF dans les extraits protéiques totaux des lignées U251, U251R et U87 traitées 72h au TMZ 50µM. (B) Dosage du HBEGF dans le surnageant des lignées placées dans du milieu à 0,1% SVF et traitées 72h au TMZ 50µM.

## 1.2 Marquage du HBEGF par immunocytochimie

Pour confirmer les résultats obtenus avec le dosage par ELISA nous avons marqué le HBEGF par immunocytochimie (Figure 47). La lignée U251R a un niveau basal de HBEGF supérieur à la lignée U251 dont le HBEGF n'est pratiquement pas détectable. Soixante-douze heures après traitement au TMZ 50µM les cellules U251 sensibles surexpriment le HBEGF, tandis qu'il n'y a pas d'augmentation dans la lignée U251R. Comparativement aux deux lignées précédentes la lignée U87 exprime fortement le HBEGF.

L'immunomarquage du HBEGF confirme les résultats du dosage du HBEGF intracellulaire par ELISA. Le HBEGF n'est pas détecté dans le surnageant des U251. Pour exclure un rôle du HBEGF soluble, nous avons vérifié son action sur la viabilité des lignées U251 et U87.

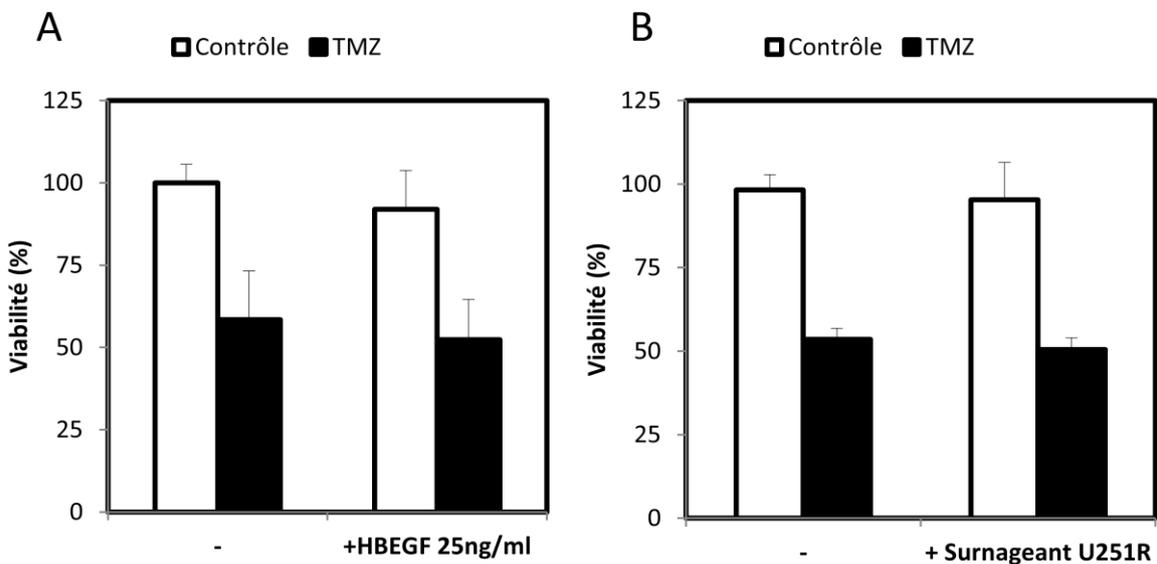


**Figure 47 Immunomarquage du HBEGF.** Cellules traitées 72h au TMZ 50 $\mu$ M puis immunomarquées pour le HBEGF (vert). Le noyau a été coloré au Draq5 (violet). Les photos ont été prises avec un objectif x20 monté sur un Zeiss Axiovert.

## 2 HBEGF et cytotoxicité

### 2.1 Ajout de HBEGF recombinant et surnageant de U251R

Pour savoir si l'ajout de HBEGF soluble recombinant pouvait protéger les cellules U251 de la mort induite par le TMZ, nous avons soumis nos cellules à un co-traitement. Aucun effet sur la cytotoxicité du TMZ n'est observé à 72h dans la lignée U251 (Figure 48A). De même, l'ajout du surnageant de la lignée U251R prétraitée au TMZ ne protège pas la lignée U251 sensible du TMZ (Figure 48B).



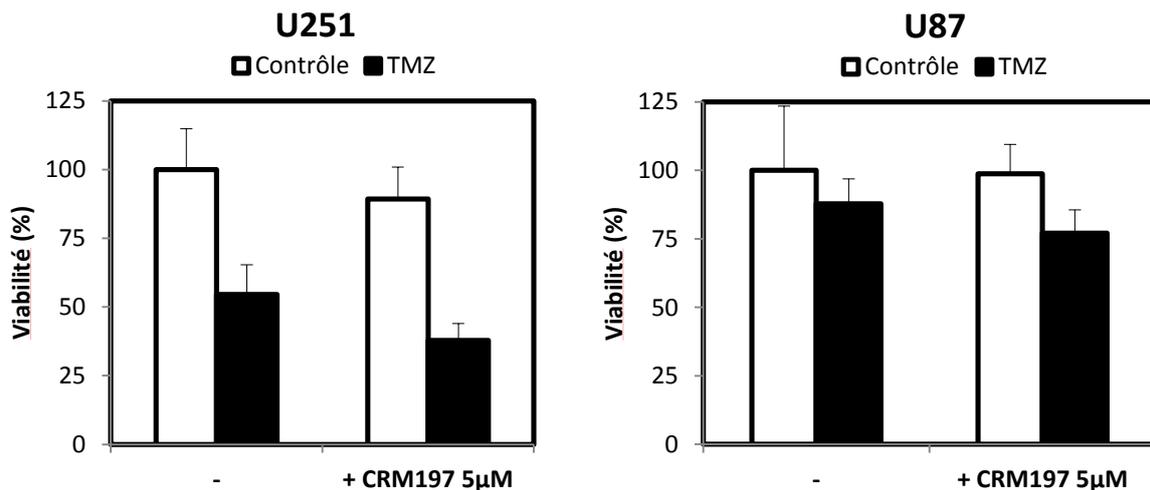
**Figure 48 Cotraitement au HBEGF soluble et surnageant de U251R.** (A) Les cellules U251 sont cotraitées avec 25ng/ml de HBEGF soluble recombinant et du TMZ 50 $\mu$ M, la viabilité est établie à 72h par MTT. (B) Le surnageant des cellules U251R traitées en continu au TMZ est ajouté aux cellules U251 qui sont traitées 72h au TMZ 50 $\mu$ M.

Le HBEGF soluble ne protège pas la lignée U251 du TMZ. De même la lignée U251R ne semble pas exprimer de facteurs solubles capables de protéger les cellules U251 sensibles du TMZ. À l'inverse, nous nous sommes demandés si une inhibition du HBEGF pouvait sensibiliser les lignées U251 et U87 au TMZ.

## 2.2 Inhibition du HBEGF par le CRM197

Le HBEGF sert de récepteur pour la toxine diphtérique. Un mutant non-toxique de la toxine, le CRM197 est capable de se lier spécifiquement au domaine EGF-like de la forme membranaire et de la forme soluble du HBEGF inhibant ainsi sa fixation à l'EGFR. De nombreuses études rapportent que l'emploi du CRM197 induit l'apoptose, inhibe l'invasion et la migration et diminue la prolifération dans différentes lignées. Ainsi il peut agir en synergie avec la chimiothérapie notamment avec le paclitaxel dans le cancer ovarien.

Nous avons traité les lignées U251 et U87 avec du CRM197 seul ou combinaison avec du TMZ (Figure 49). Le CRM197 seul n'induit pas de mort cellulaire et n'active pas les caspases dans nos lignées (non montré). En combinaison avec le TMZ il n'augmente pas la mort cellulaire.

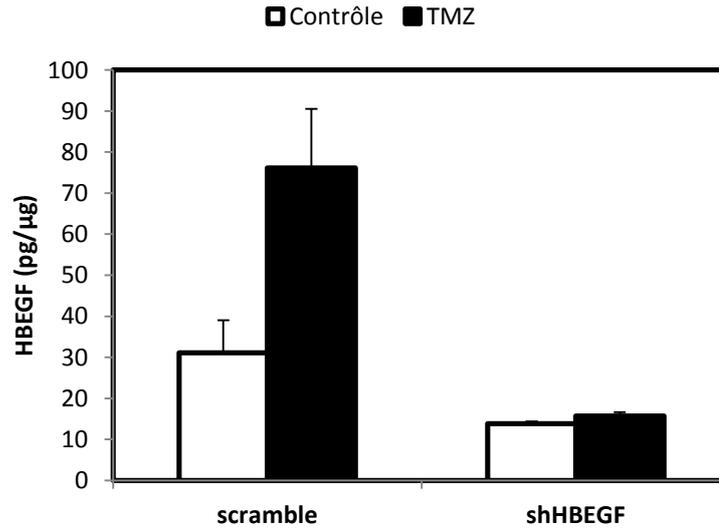


**Figure 49 Inhibition du HBEGF par le CRM197.** Les lignées U251 et U87 sont cotraitées avec du CRM197 à 5µM et du TMZ 50µM pendant 72h.

Pris ensemble, ces résultats excluent une action du HBEGF soluble sur la viabilité de nos lignées U251 et U87 en réponse au TMZ.

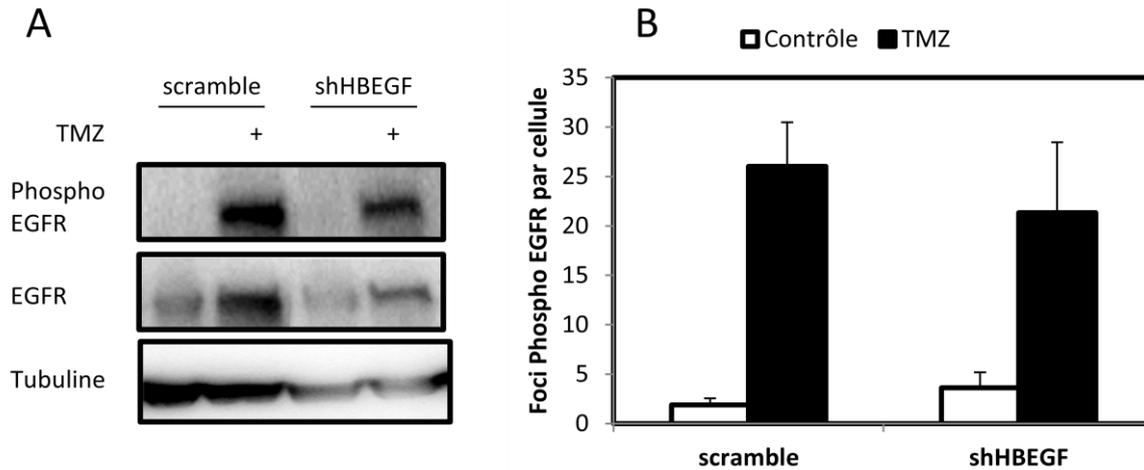
### 3 HBEGF et EGFR

Le proHBEGF ancré à la membrane cellulaire est capable de se lier de manière juxtacrine à EGFR. Cette liaison inhibe la phosphorylation d'EGFR et empêche l'induction de la prolifération. Nous avons regardé la phosphorylation de l'EGFR en réponse au TMZ dans la lignée U251 invalidée ou non pour le HBEGF par shRNA (Figure 50).



**Figure 50 Invalidation du HBEGF.** Dosage ELISA du HBEGF dans les lignées U251-scramble et U251-shHBEGF traitées au TMZ 50μM à 72h. Dans la lignée U251-shHBEGF le dosage est à la limite de sensibilité du test qui est d'environ 13 pg/ml.

Le TMZ induit une phosphorylation de la tyrosine 1068 d'EGFR, impliqué dans l'activation des voies Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt, Stat-3, qui n'est pas perturbée par l'absence de HBEGF (Figure 51).



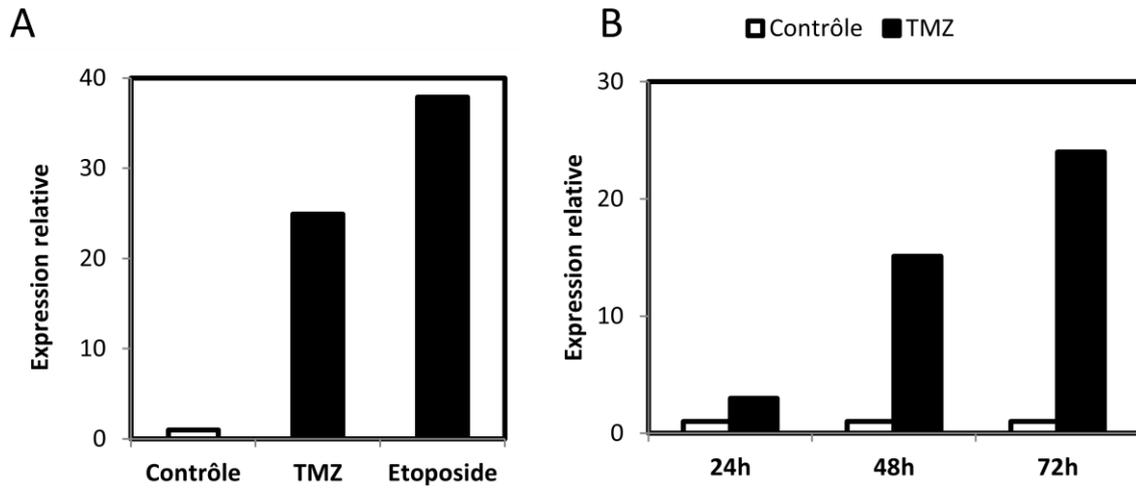
**Figure 51 Phosphorylation d'EGFR.** (A) Activation de la tyrosine 1068 d'EGFR dans les cellules U251 72h après TMZ 50 $\mu$ M. (B) Quantification d'EGFR activé par P-LISA, 72h après traitement TMZ 50 $\mu$ M.

Le HBEGF n'a pas d'impact sur la phosphorylation d'EGFR induite par le TMZ. Par ailleurs l'analyse par QPCR de l'expression de HER4 par QPCR montre une quantité infime dans la lignée U251 qui n'est pas affectée par un traitement TMZ (non montré). Nous avons donc exclu un rôle du HBEGF sur ce récepteur. Il est donc possible que le HBEGF ait un rôle indépendant. Une question reste en suspens quant à l'origine de la surexpression du HBEGF, est-elle ou non spécifique du TMZ ?

## 4 Le HBEGF et dommages de l'ADN

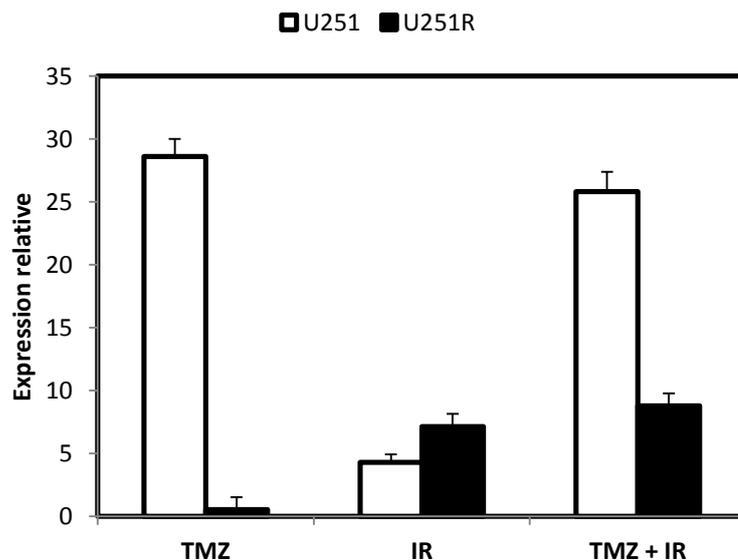
### 4.1 Le HBEGF réponse aux dommages de l'ADN

Les cellules U251 ont été traitées avec 1 $\mu$ M d'étoposide, un inhibiteur des topoisomérases. À 72h, l'étoposide induit une augmentation de l'expression de l'ARN du HBEGF similaire à celle obtenue avec un traitement au TMZ (Figure 52A). Une cinétique entre 24 et 72h dans les cellules U251 traitées à 50 $\mu$ M de TMZ montre que le HBEGF augmente au cours du temps (Figure 52B).



**Figure 52 Expression du HBEGF.** (A) Expression relative au contrôle du HBEGF par QPCR dans la lignée U251 traitées 72h au TMZ (50µM) ou à l'étoposide (1µM). (B) Cinétique d'apparition du HBEGF par QPCR dans la lignée U251 traité avec 50µM de TMZ. Ces deux expériences n'ont été réalisées qu'une fois.

Cette cinétique d'apparition du HBEGF n'est pas sans rappeler la cinétique d'accumulation des dommages doubles brins induit par le TMZ dans la lignée U251 (Figure 38B). L'induction de cassures directes de l'ADN par irradiation (5 Gy), induit une augmentation du HBEGF dans la lignée U251 mais aussi dans la lignée U251R (Figure 53).

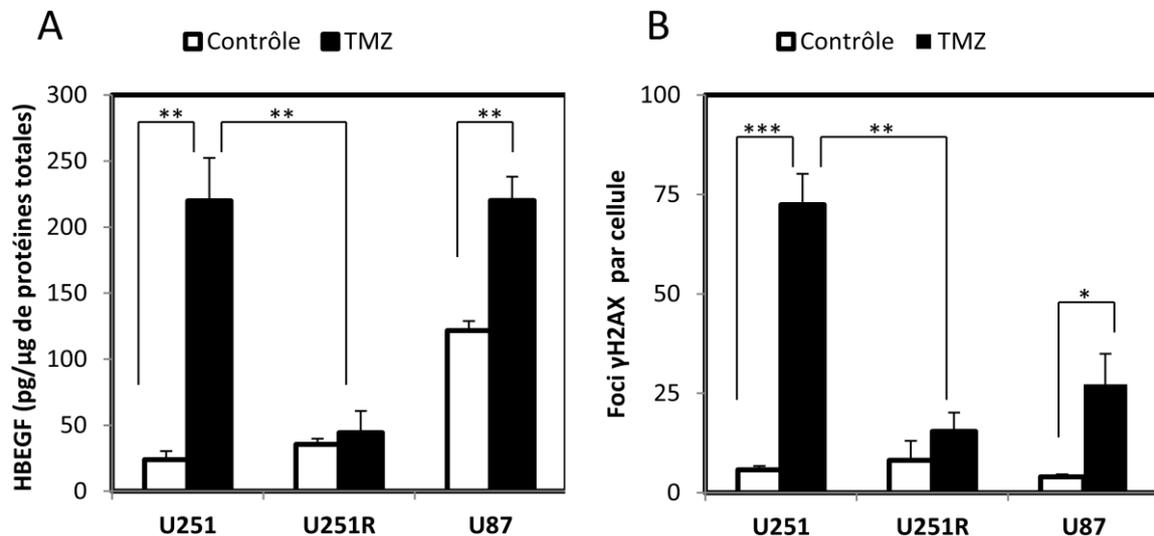


**Figure 53 Expression du HBEGF en réponse à l'irradiation.** Expression relative au contrôle du HBEGF par QPCR dans les lignées U251 et U251R 72h après traitement au TMZ (50µM) et irradiation (5Gy).

La surexpression du HBEGF n'est pas spécifique au TMZ puisque l'étoposide et les rayons  $\gamma$  provoquent la même réponse dans la lignée U251. L'irradiation des cellules U251R provoque aussi une surexpression du HBEGF alors que le TMZ n'a aucun effet. Ces données suggèrent donc l'existence d'une relation entre l'expression du HBEGF et les dommages de l'ADN.

## 4.2 Corrélation entre l'expression du HBEGF et les foci $\gamma$ H2AX

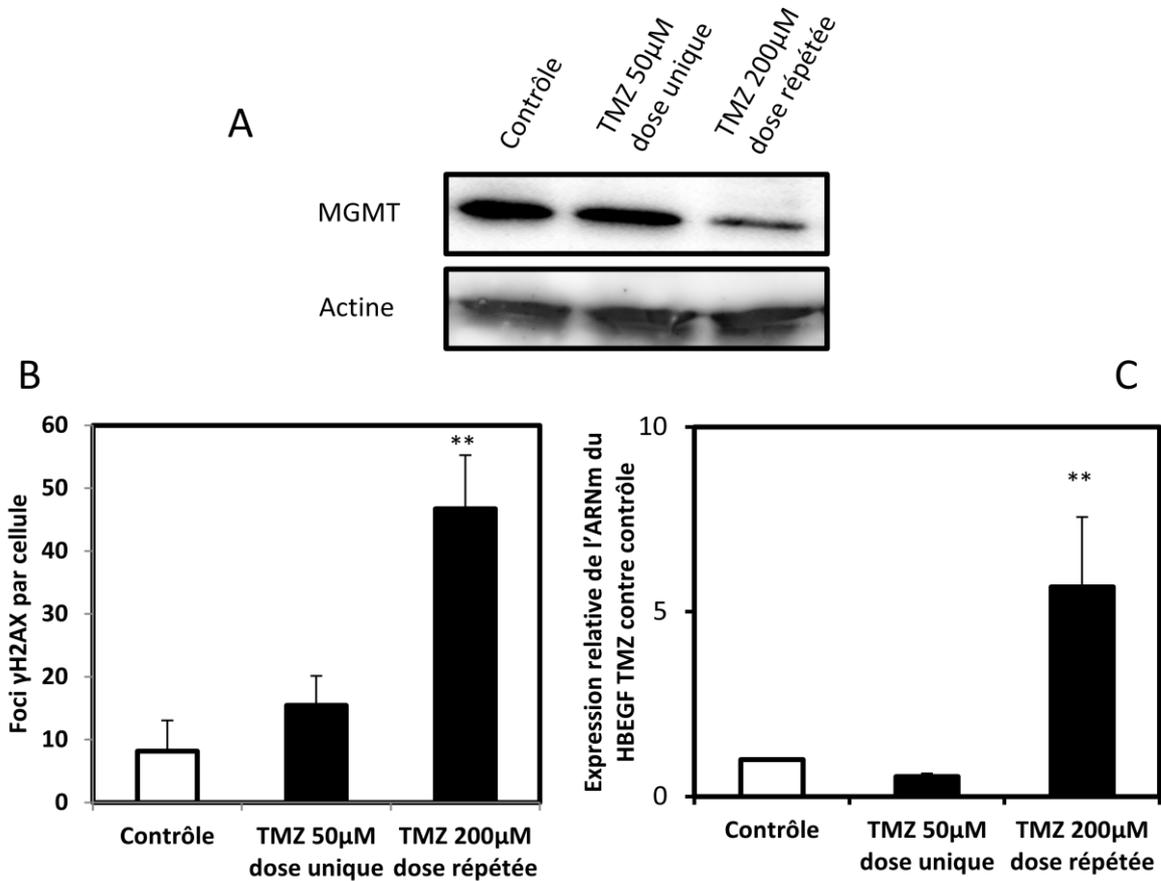
Lorsque l'on compare l'expression du HBEGF induite par le TMZ dans les lignées U251, U251R et U87 (Figure 54A) et l'activation des foci  $\gamma$ H2AX (Figure 54B), nous voyons une corrélation entre ces données. Ainsi nous avons émis l'hypothèse que le HBEGF pouvait être une réponse aux dommages doubles brins de l'ADN.



**Figure 54 Parallèle entre expression du HBEGF et foci  $\gamma$ H2AX.** (A) Quantification du HBEGF total par ELISA 72h après traitement TMZ 50 $\mu$ M. (B) Quantification des foci  $\gamma$ H2AX par immunocytochimie 72h après traitement TMZ.

La MGMT répare les alkylations produites par le TMZ dans la lignée U251R et empêche la formation de cassures doubles brins. Une unité d'enzyme se lie de façon covalente à un groupement méthyl, une unité d'enzyme est donc perdue pour chaque groupement éliminé. La capacité de réparation de la cellule est donc dépendante de la quantité d'unités enzymatique. Pour saturer la capacité de réparation de l'enzyme MGMT, la lignée U251R a été traitée par de fortes doses répétées de TMZ (200 $\mu$ M/j pendant 3jours) (Figure 55A). Dans

ces conditions, une réapparition des foci  $\gamma$ H2AX (Figure 55B) concomittante avec une augmentation de l'ARNm du HBEGF (Figure 55C) est observée.



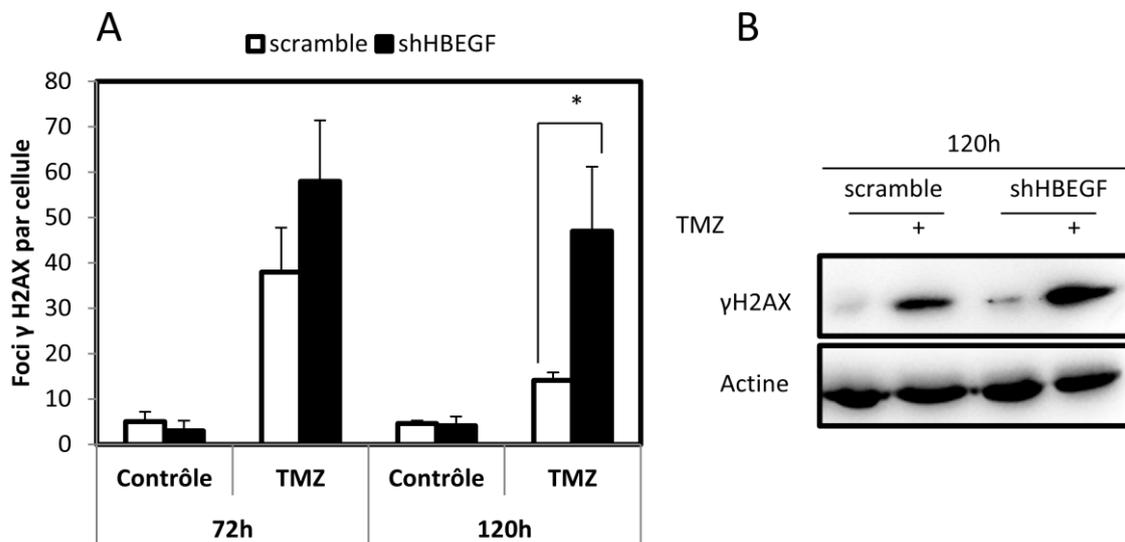
**Figure 55 Saturation de la MGMT dans la lignée U251R.** (A) Une dose répétée sur 72h de 200 $\mu$ M de TMZ permet de diminuer la quantité de MGMT dans la lignée U251R. (B) Mesure de la quantité de foci  $\gamma$ H2AX par immunocytochimie à 72h. (C) Mesure de la quantité d'ARNm du HBEGF par QPCR à 72h.

L'apparition simultanée des foci  $\gamma$ H2AX et du HBEGF dans la lignée U251R suggère que le HBEGF peut jouer un rôle dans la réparation ou la signalisation des dommages de l'ADN.

### 4.3 Le HBEGF et réparation des cassures doubles brins

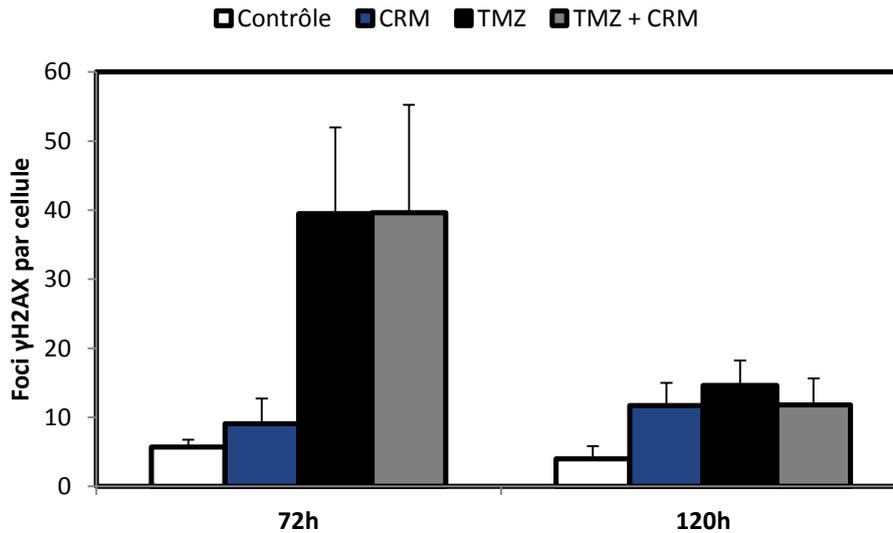
#### 4.3.1 Invalidation de HBEGF et foci $\gamma$ H2AX

Le nombre de foci  $\gamma$ H2AX a été mesuré à 72h et 120h dans les cellules U251-shHBEGF traitées à 25 $\mu$ M de TMZ (Figure 56). À 72h les cellules invalidées pour le HBEGF tendent à avoir plus de dommages. En revanche si on laisse les cellules récupérer pendant deux jours, les U251-shHBEGF présentent encore beaucoup de foci  $\gamma$ H2AX alors que les U251-scramble n'en ont presque plus.



**Figure 56 Extinction du HBEGF et foci H2AX.** (A) Quantification des foci  $\gamma$ H2AX dans les cellules U251 invalidées ou non pour le HBEGF traitées avec 25 $\mu$ M de TMZ. Pour le temps 120h, le milieu a été changé à 72h. (B) Western blot de  $\gamma$ H2AX à 120h après traitement au TMZ 25 $\mu$ M. Pour ces deux expériences la dose de 25 $\mu$ M se justifie pour une meilleure visibilité des différences observées à 120h.

Nous avons réalisé la même expérience en inhibant le HBEGF par du CRM197 et nous ne retrouvons pas de différence avec les cellules non traitées (Figure 57).

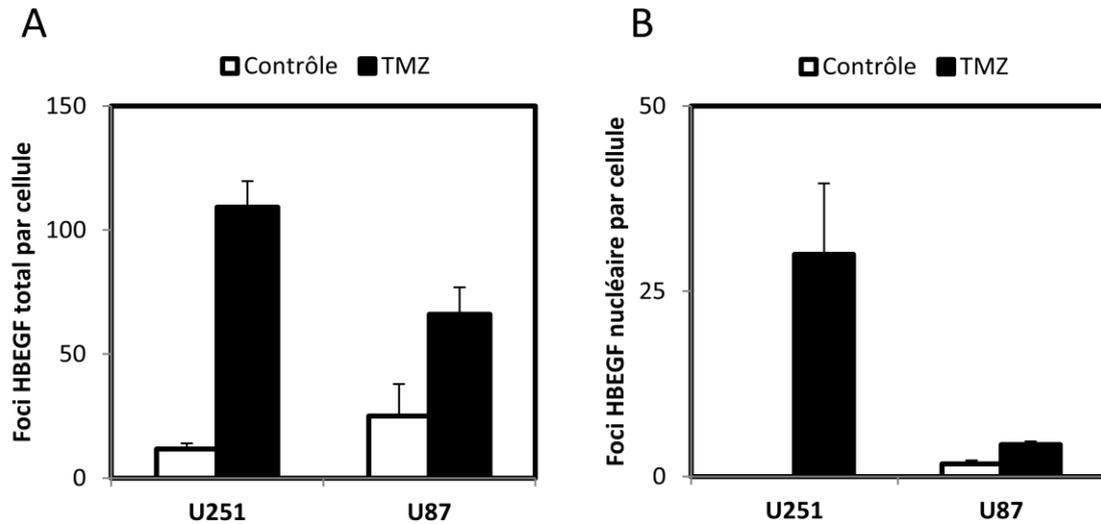


**Figure 57 Inhibition du HBEGF par le CRM197 et foci  $\gamma$ H2AX.** Quantification des foci  $\gamma$ H2AX par immunocytochimie dans les cellules U251 traitées au CRM197 5 $\mu$ g/ml et TMZ 25 $\mu$ M. Pour le temps 120h, le milieu a été changé à 72h.

Le HBEGF a une influence sur la réparation des dommages doubles brins dans la lignée U251. Il existe une séquence de localisation nucléaire (NLS) dans le domaine liant l'héparine (situé dans l'ectodomaine) du proHBEGF (Raab et Klagsbrun, 1997). Adam et al. sont les seuls à avoir montré le proHBEGF pouvait se localiser au noyau et que ce phénomène est corrélé avec le grade des carcinomes transitionnels de la vessie (Adam et al., 2003)(Adam et al. 2003). Nous avons donc regardé la localisation du HBEGF dans nos cellules après traitement au TMZ.

#### **4.3.2 Translocation au noyau du HBEGF**

Nous n'avons pas pu détecter le HBEGF par ELISA sur des fractionnements nucléaires de nos cellules. Cependant la technique de P-LISA nous a permis grâce à deux anticorps de régions distinctes, de marquer spécifiquement le proHBEGF. Le nombre de proHBEGF total par cellule augmente de façon similaire à nos précédents résultats dans les deux lignées (Figure 58A). Nous avons pu aussi estimer le nombre de foci localisés dans le noyau 72h après traitement au TMZ dans les lignées U251 et U87 (Figure 58B). La localisation du proHBEGF dans le noyau augmente significativement dans la lignée U251 traitée au TMZ, mais pas dans la lignée U87.

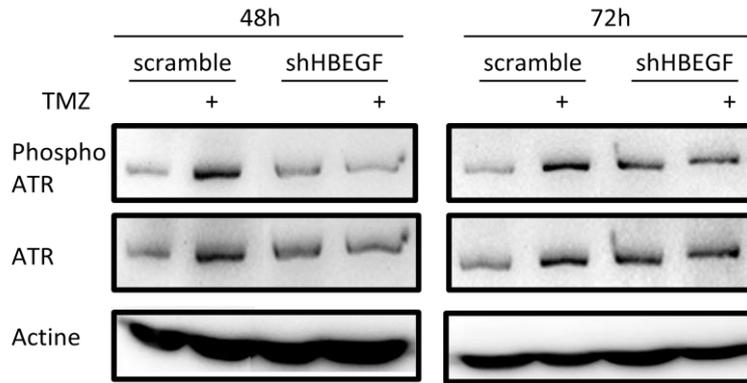


**Figure 58 Localisation du proHBEGF.** Quantification du proHBEGF (A) total et (B) nucléaire dans les lignées U251 et U87 72h après traitement TMZ (50µM). La quantification des foci a été réalisé grâce aux plugins Colocalization et Object counter 3D sous ImageJ.

La localisation nucléaire du proHBEGF dans la lignée U251 est une piste tangible d'une participation éventuelle dans les mécanismes de réparation et pourrait expliquer sa relation avec  $\gamma$ H2AX.

### 4.3.3 Activation d'ATR

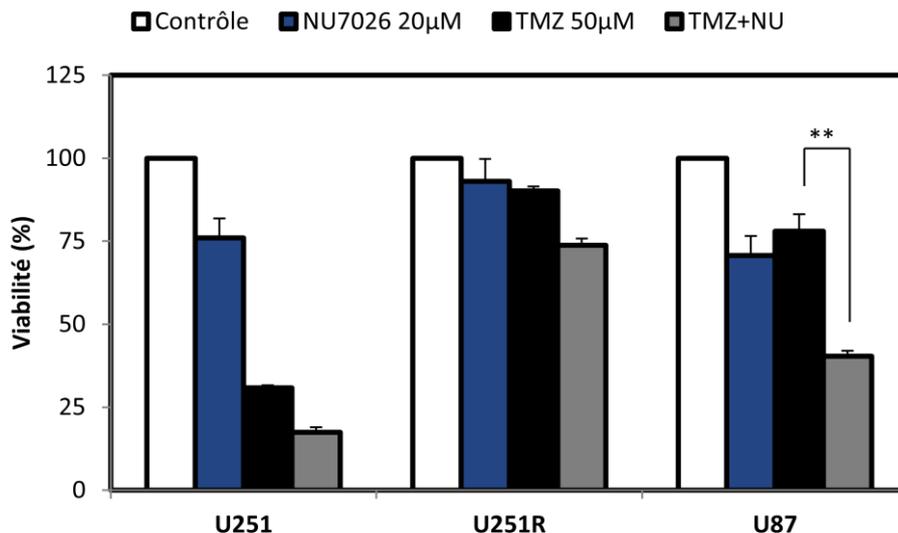
La phosphorylation d'H2AX est induite en réponse aux dommages à l'ADN par des sérine/thréonines kinases telles qu'ATR, ATM ou DNA-PK. Des résultats préliminaires nous indiquent que la signalisation des dommages à l'ADN par le TMZ passe par une activation d'ATR dans la lignée U251 dès 48h (Figure 59). Dans la lignée U251-shHBEGF, la phosphorylation d'ATR n'apparaît qu'à 72h. Ces résultats n'ont cependant pas été répétés. L'invalidation du HBEGF dans la lignée U251 semble retarder la phosphorylation de cette protéine kinase. Le HBEGF pourrait jouer un rôle dans la signalisation des dommages doubles brins en participant à l'activation d'ATR.



**Figure 59 Activation d'ATR.** Western blot de la phosphorylation d'ATR dans la lignée U251 invalidée ou non pour HBEGF à 48 et 72h après traitement TMZ 50µM.

#### 4.3.4 Rôle de DNA-PK

Contrairement à la lignée U251, nous n'avons pas trouvé d'augmentation du proHBEGF nucléaire dans la lignée U87. Le TMZ induit cependant des dommages doubles brin dans cette lignée, mais ceux-ci sont moins importants que dans la lignée U251 (Figure 11B). L'inhibition de DNA-PKc par le NU7026 (20µM) augmente la cytotoxicité du TMZ (50µM) à partir de 120h dans la lignée U87 mais pas dans les lignées U251 et U251R (Figure 50). La lignée U87 s'appuie donc sur l'activité de la DNA-PK pour survivre aux dommages causés par le TMZ.



**Figure 60 Inhibition de DNA-PKc.** Les lignées U251, U251R et U87 ont été traitées 120h au TMZ 50µM et au NU7026 20µM. La viabilité a été mesurée en fonction du contrôle non traité par MTT.

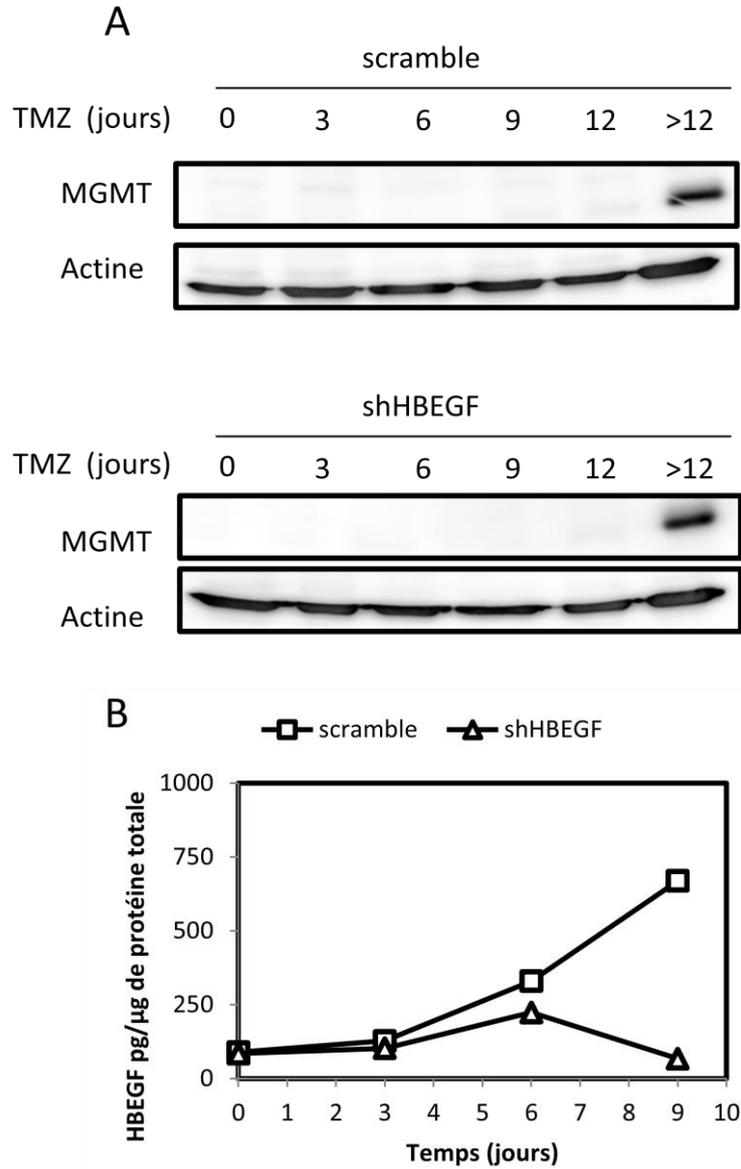
Ces pistes laissent présumer de voies de signalisation et de réparation des cassures doubles brins différentes dans les lignées U87 et U251 et l'implication du proHBEGF reste encore à éclaircir dans ces lignées.

## **5 Le HBEGF et la résistance au TMZ dans la lignée U251**

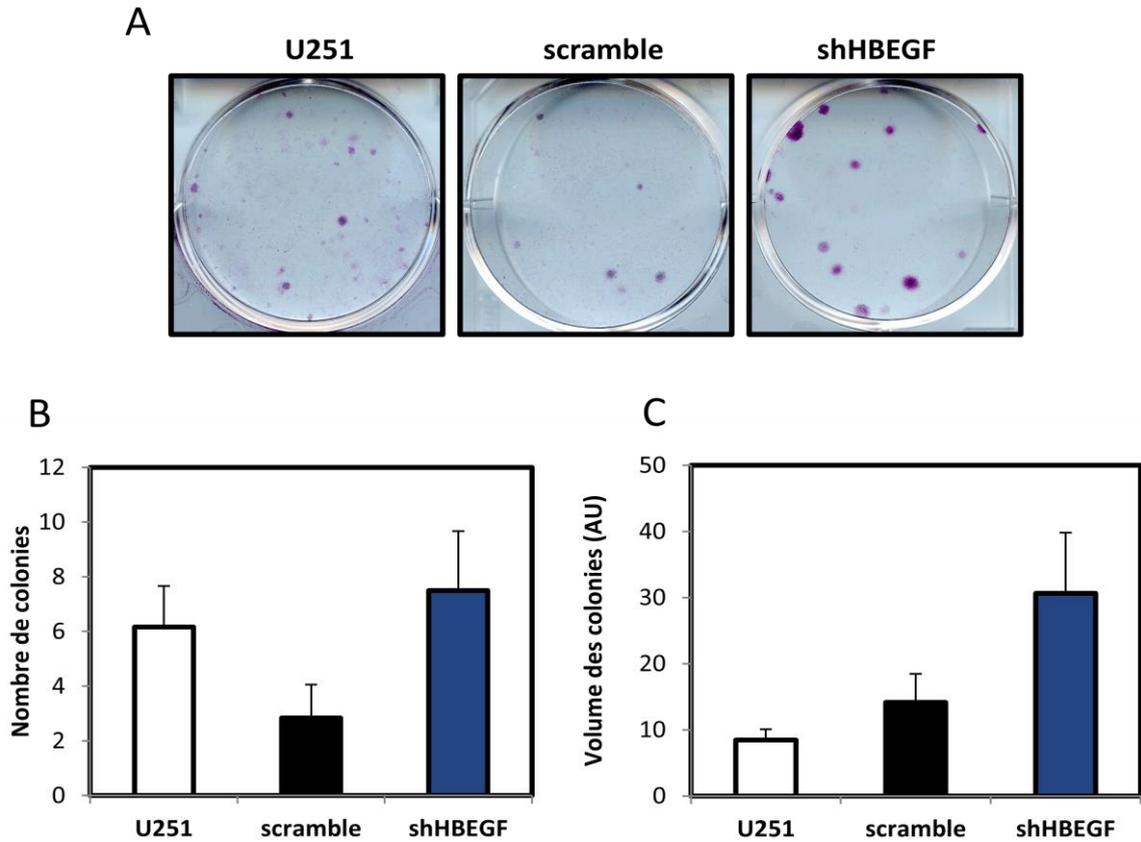
La lignée U251R ne surexprime plus de HBEGF en réponse au TMZ. Nous avons voulu savoir si le HBEGF était essentiel à l'acquisition de la résistance. Suivant le protocole précédemment décrit (cf. 2.2.2.), nous avons traité en continu des cellules U251 invalidées pour le HBEGF. La diminution de HBEGF n'empêche pas les cellules de devenir résistantes et d'exprimer la MGMT au bout de 12 jours (Figure 61).

Cependant, nous avons remarqué que lors de l'acquisition de la résistance au TMZ, les cellules U251-shHBEGF forment des colonies plus grosses (Figure 62). L'extinction du HBEGF semble donc favoriser la survie des cellules U251.

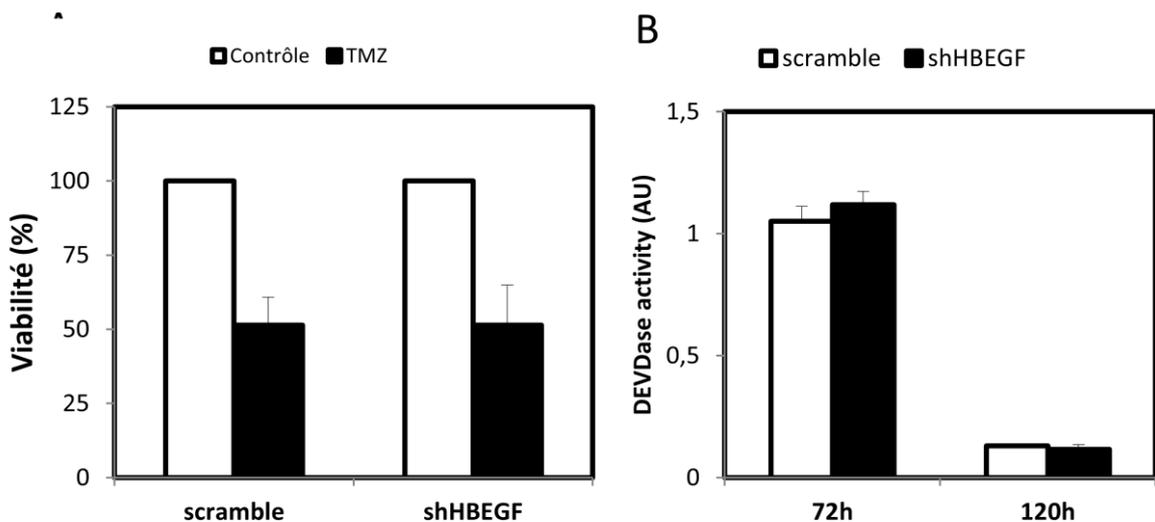
L'extinction du HBEGF n'a pourtant aucun effet sur la viabilité des cellules U251 traitées au TMZ à 72h (Figure 63A). De même, l'activité caspase relevée est identique à la lignée scramble (Figure 63B). Nous avons le même pic d'activité caspase à 72h puis une diminution de cette activité au bout de 120h. Pour expliquer cela nous nous sommes tournés vers l'expression des protéines de la famille Bcl2 en réponse au TMZ dans la lignée U251-shHBEGF.



**Figure 61 Expression de la MGMT.** (A) Cinétique d'apparition de MGMT dans la lignée U251 invalidée ou non pour le HBEGF et traitée au TMZ 25μM. (B) Dosage du HBEGF par ELISA.



**Figure 62 Résistance au TMZ.** (A) Photographies des colonies formées par les cellules U251 invalidées ou non pour le HBEGF. Les cellules ont été colorées au crystal violet. (B) Nombre de colonies formées. (C) Taille des colonies mesurée avec le logiciel Bio-ID.

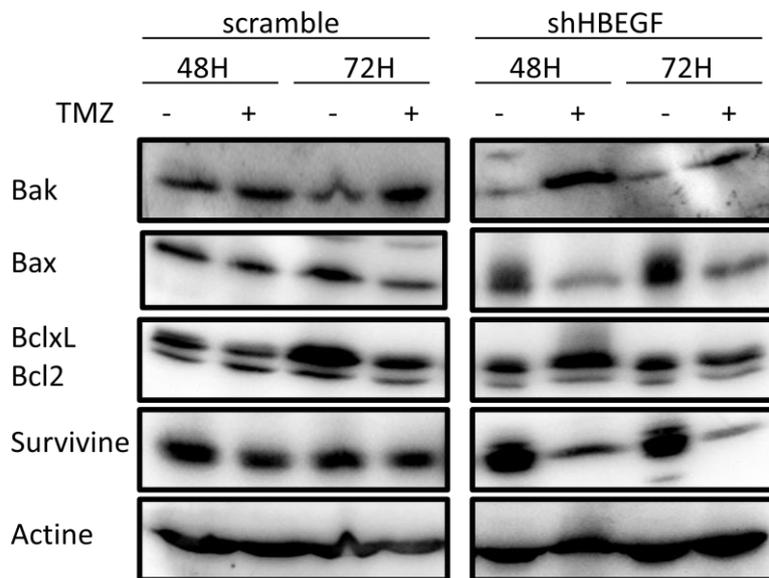


**Figure 63 Rôle du HBEGF dans la mort induite par le TMZ.** (A) viabilité mesurée par MTT à 72h après traitement TMZ 50µM. (B) Activité caspase mesurée dans les cellules traitées au TMZ 50µM.

## 6 Le HBEGF et protéines de la famille Bcl2

### 6.1 L'extinction du HBEGF module l'expression de Bax, Bak et de survivine

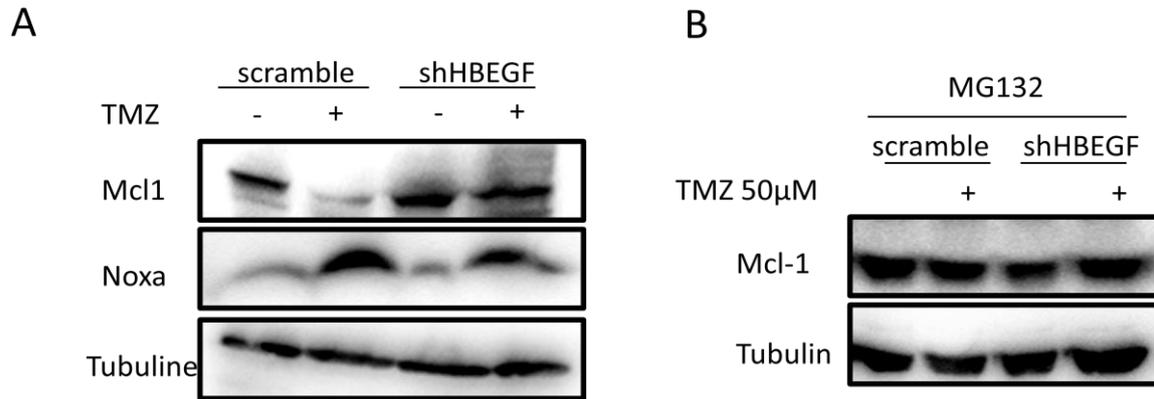
Alors que le TMZ a peu d'effet sur les protéines Bax, Bak, Bcl2, Bcl-XL et survivine dans la lignée U251-scramble, des résultats préliminaires montrent qu'il induit de nombreux changements dans la lignée U251-shHBEGF (Figure 64). On peut noter une augmentation de Bak et de Bcl-xL et une diminution de Bax et de la survivine dès 48h.



**Figure 64 Expression des protéines pro- et antiapoptotiques.** Les cellules sont traitées 72h avec 50µM de TMZ.

### 6.2 Le proHBEGF régule la dégradation de Mcl-1 induite par le TMZ.

Le TMZ induit une apoptose dépendante de Bak via une dégradation de Mcl-1 (Gratas et al. 2013, Partie 1). Dans les cellules U251-shHBEGF, Mcl-1 n'est pas dégradé 72h après traitement au TMZ 50µM malgré l'induction de Noxa (Figure 65A). La dégradation de Mcl-1 par le TMZ est inhibée par le MG132 dans la lignée U251 donc elle est bien dépendante du protéasome (Figure 65B).

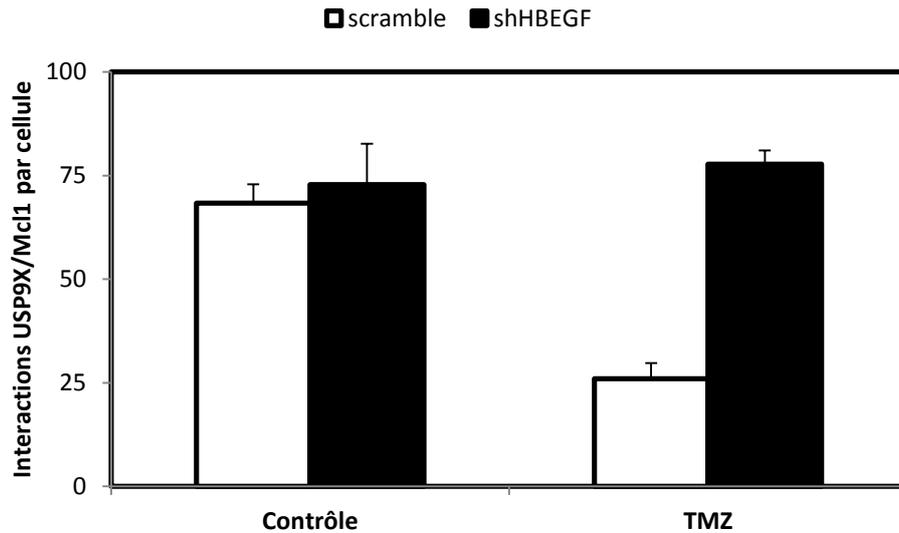


**Figure 65 Dégradation de Mcl-1 en fonction du statut HBEGF.** (A) Les cellules sont traitées 72h avec 50μM de TMZ et (B) vingt-quatre heures avant de les récupérer du MG132 à 10μM est ajouté.

### 6.3 La dégradation de Mcl-1 par le TMZ dépend d'USP9X

Mcl-1 est la protéine de la famille Bcl2 la plus étudiée du point de vue de sa dégradation qui est majoritairement dépendante du système ubiquitine/protéasome. Au moment du déclenchement de l'apoptose Mcl-1 peut être rapidement dégradée par l'augmentation de son ubiquitination notamment via l'activité d'ARF-BP1/Mule (Mcl-1 ubiquitin ligase E3). En condition non-apoptotique, Mcl-1 est protégée de la dégradation par la déubiquitinase USP9X.

Nous avons analysé les interactions entre Mcl-1 et USP9X après traitement TMZ à 48h par P-LISA. En absence de traitement, USP9X interagit fortement avec Mcl-1, alors que sous TMZ ces interactions diminuent significativement (Figure 66). L'invalidation du HBEGF permet au contraire de maintenir les interactions entre USP9X et Mcl-1.



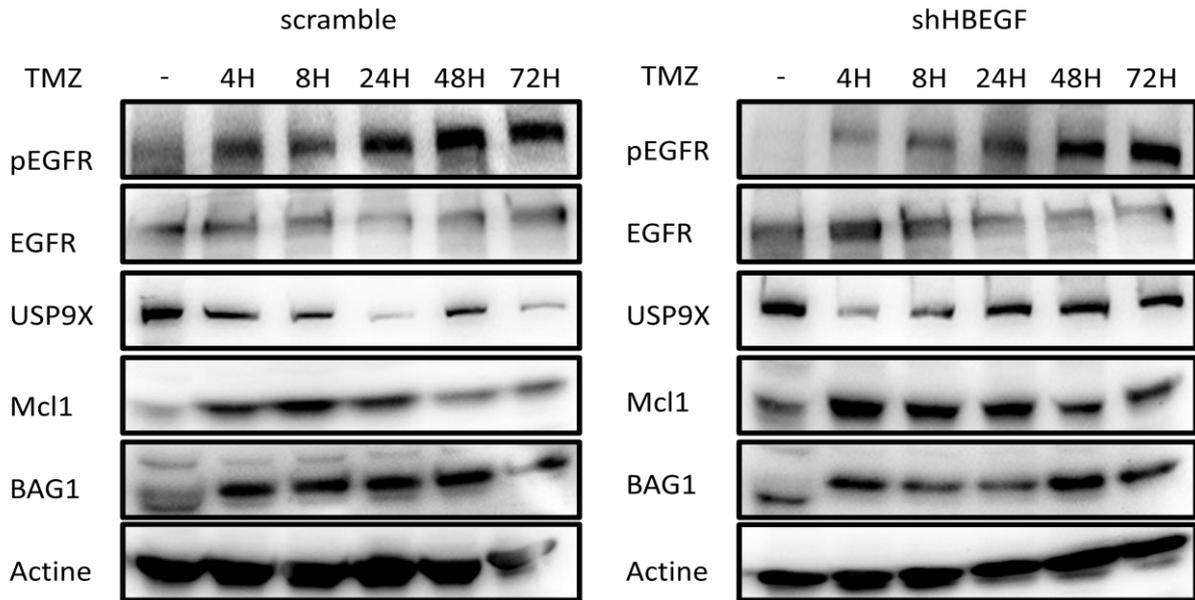
**Figure 66 Interactions Mcl-1/USP9X.** Les interactions entre Mcl-1 et USP9X ont été quantifiées par P-LISA dans les cellules U251 traitées au TMZ 50µM pendant 48h.

Le HBEGF est impliqué dans la perte d'interaction entre Mcl-1 et USP9X en réponse au TMZ dans la lignée U251. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'interaction directe entre HBEGF et USP9X, ce qui sous-entend qu'il manque un ou plusieurs partenaires impliqués dans ce mécanisme.

#### 6.4 BAG1, le chaînon manquant ?

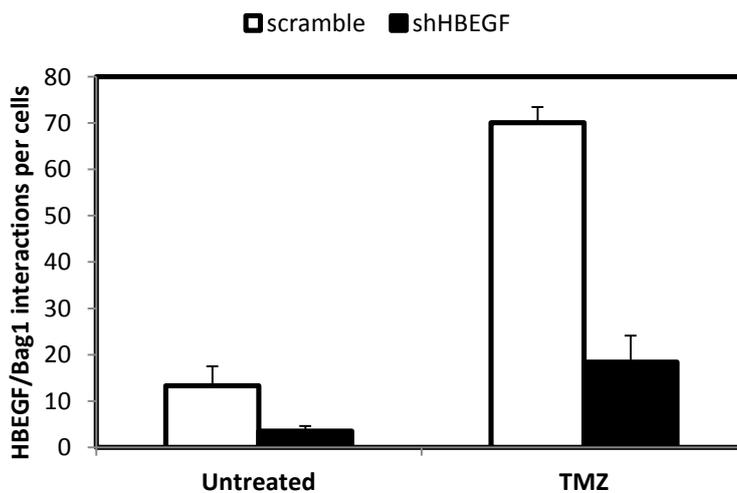
La littérature n'évoque qu'un seul partenaire direct connu du proHBEGF, il s'agit de BAG1, une protéine cochaperonne aux propriétés antiapoptotiques. De manière intéressante BAG1 est connu pour réguler Mcl-1 via des interactions avec sa déubiquitinase USP9X. Nous nous sommes donc intéressés aux interactions liant ces quatre protéines.

L'analyse de l'expression de BAG1, de Mcl-1 et d'USP9X dans la lignée U251 montre qu'USP9X est dégradée à 24h et à 72h. La dégradation de Mcl-1 en réponse au TMZ commence dès 48h et jusqu'à 72h (Figure 67). Au contraire, dans les cellules U251-shHBEGF, les niveaux d'USP9X et de Mcl-1 restent constants sous traitement TMZ. BAG1 reste constant dans les deux lignées.



**Figure 67 Cinétique d'expression de Mcl-1 et USP9X.** Les cellules sont traitées 72h avec 50 $\mu$ M de TMZ.

Nous avons analysé l'interaction entre HBEGF et BAG1 par P-LISA dans les cellules U251 scramble et shHBEGF(Figure 68). Quarante-huit heures après traitement TMZ (50 $\mu$ M), c'est-à-dire le moment où débute la dégradation de Mcl-1, nous voyons une augmentation des interactions entre HBEGF et BAG1 dans les cellules U251 scramble.



**Figure 68 Interactions HBEGF/BAG1.** Les interactions entre HBEGF et BAG1 ont été quantifiées par P-LISA dans les cellules U251 scramble et shHBEGF traitées au TMZ 50 $\mu$ M pendant 48h.

En conclusion, le TMZ induit une surexpression du HBEGF dans la lignée U251. Même si EGFR est phosphorylé en réponse au TMZ, le HBEGF n'a pas de rôle majeur dans cette activation. L'expression du proHBEGF est corrélée avec l'activation de H2AX. Le proHBEGF est retrouvé dans le noyau des cellules U251. Il peut donc potentiellement jouer un rôle dans la réparation et/ou la signalisation des dommages doubles brins de l'ADN voire dans l'expression de protéine comme par exemple la survivine.

Nos résultats montrent pour la première fois que le proHBEGF, régule la dégradation de Mcl-1 induite par le traitement au TMZ. En effet le proHBEGF est impliqué dans la perte d'interaction entre Mcl-1 et sa déubiquitineuse USP9X. Nous proposons un modèle où en réponse aux dommages à l'ADN, le proHBEGF va interagir avec BAG1 et peut-être le séquestrer, ce qui empêche BAG1 de maintenir l'expression d'USP9X et entraîne en conséquence la dégradation de Mcl-1.

# **DISCUSSION**

---

Le TMZ est aujourd'hui considéré comme le traitement chimiothérapeutique de référence dans le GBM. Cependant face à la résurgence de ces tumeurs, il est essentiel de comprendre les mécanismes de résistance émergents et de trouver de nouvelles options thérapeutiques. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés d'une part à l'induction de la mort dans les cellules de GBM mais aussi aux mécanismes qui interviennent dans la résistance au TMZ. Nous avons pu montrer l'importance de l'axe Mcl-1/Bak dans la réponse au TMZ et l'implication du HBEGF dans la régulation de la dégradation de Mcl-1.

## **1 Mécanismes de mort du TMZ**

### **1.1 L'importance de l'axe Mcl-1/Bak dans l'apoptose induite par le TMZ**

Le TMZ est décrit comme un agent pro-autophagique et pro-apoptotique (Knizhnik et al., 2013). Cependant les mécanismes d'induction de l'apoptose mitochondriale par le TMZ ne sont pas connus. En invalidant les protéines pro-apoptotiques effectrices Bax et Bak, nous avons montré que leurs rôles étaient non redondants dans le cas du TMZ. En effet la perte de Bak et non celle de Bax induit une diminution de l'activité des caspases effectrices en réponse au TMZ qui se traduit par une diminution de la mort cellulaire dans les lignées U251 et LN18. On peut noter que dans la lignée sensible U251, l'activité des caspases est observable à des doses clinique de TMZ (<100 $\mu$ M), alors que pour la lignée résistante LN18 qui exprime l'enzyme de réparation MGMT il est nécessaire d'utiliser des doses supérieures à 250 $\mu$ M. L'extinction de Bak n'abolit pas totalement la mort cellulaire ni l'activité caspase dues au TMZ dans la lignée U251. Il a déjà été montré qu'un autre agent alkylant, le MNNG induit une mort passant par Bax indépendante des caspases appelée nécroptose (Baritaud et al., 2012). Nous ne savons pas si le TMZ est capable d'induire la nécroptose dans nos cellules par contre nous avons détecté une légère activité LDH synonyme de nécrose.

Au contraire de Bax qui doit subir un changement de conformation et s'insérer dans la membrane mitochondriale, Bak est déjà ancré dans la membrane et il est associé à la protéine anti-apoptotique Mcl-1 qui le maintient inactif (Cuconati et al., 2003). Dès lors l'activation de Bak est dépendante de la régulation de Mcl-1 en réponse à un stimulus apoptotique. En réponse au TMZ, les lignées U251 et LN18 montrent une dégradation de Mcl-1 72h après traitement. De plus l'extinction de Mcl-1 par pARNi augmente la sensibilité au TMZ dans les

deux lignées. On remarque aussi que l'extinction de Mcl-1 dans la lignée U251 est suffisante pour entraîner une activation des caspases. En revanche, l'inhibition concomitante de Bcl-2 et Bcl-xL, par l'ABT-737, un BH3-mimétique, en co-traitement avec le TMZ n'augmente pas l'activité caspase dans la lignée U251. Il a récemment été démontré que l'ABT-737 provoque une augmentation de Noxa dans la lignée U251 et que l'extinction de Mcl-1 augmente l'apoptose induite par l'ABT-737, ce qui prouve que Mcl-1 est un frein à l'efficacité de l'ABT-737 (Bertin-Ciftci et al., 2013).

La dégradation de Mcl-1 est subséquente à sa séparation avec Bak. La protéine anti-apoptotique Noxa est un partenaire privilégié de Mcl-1 et peut le conduire directement à sa dégradation (Gomez-Bougie et al., 2011). Cependant le mécanisme responsable de la séparation entre Mcl-1 et Bak reste encore inconnu. De même, il semble que la perte de Mcl-1 ne soit pas suffisante pour déclencher l'apoptose, ce qui suggère qu'un acteur tiers serait nécessaire à l'activation de Bak (Cuconati et al., 2003). L'activation de Bak peut alors dépendre d'une protéine à BH3-seul activatrice telle que Bid, Bim ou Puma.

## 1.2 L'autophagie a-t-elle un rôle dans la réponse au TMZ ?

Nous avons utilisé plusieurs marqueurs de l'autophagie dans les lignées U251 et U87. Le clivage de LC3B et la perte de p62, signaux d'une activation de l'autophagie, ne sont pas retrouvés dans la lignée U251. La lignée U87 présente une activation basale de LC3B mais le TMZ n'augmente pas son clivage. Knizhnik *et al.* proposent un modèle où l'autophagie est l'élément central de la réponse aux dommages de l'ADN provoqués par le TMZ (Knizhnik et al., 2013). Selon ces auteurs, en réponse aux cassures double brins, l'autophagie inhibe l'apoptose et favorise l'entrée en sénescence des cellules de gliomes. À l'inverse, l'abrogation de l'autophagie, sensibilise les cellules à la mort par apoptose. Ce groupe observe une formation de vésicules dose dépendante au TMZ dès 72h dans les lignées de glioblastome LN229 et U87 avec un pic à 96h. De même ils observent un clivage de la protéine LC3B à partir de 96h. L'activité caspases apparaît à 96h et 120h respectivement pour les lignées U87 et LN229. Dans notre modèle, nous observons également une augmentation des vésicules lipidiques dans les cellules U251 à 72h mais c'est aussi le temps où l'activité des caspases a déjà commencé. De plus des données de notre laboratoire montrent que l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA dans la lignée U251 n'a pas d'effet sur l'activation des caspases en réponse au TMZ. Ces données peuvent suggérer qu'il existe une activation incomplète de l'autophagie dans la lignée U251 qui pourrait survenir plus tardivement. Une étude récente

montre que la perte de Mcl-1 diminue l'activation de l'autophagie dans les cellules cardiaques (Thomas et Gustafsson, 2013). Les cellules U251 sont très sensibles à la perte de Mcl-1. La dégradation de Mcl-1 par le TMZ pourrait donc arriver plus rapidement que l'activation complète de l'autophagie.

## 2 Résistance au TMZ

### 2.1 La MGMT suffit-elle à expliquer les phénomènes de résistance ?

L'induction de l'expression de l'enzyme de réparation MGMT dans la lignée U251 sensible abolit complètement l'activité caspase induite par le TMZ et protège les cellules de la mort. Les méthylation en position O<sup>6</sup> des guanines, cibles de la MGMT, sont donc les instigatrices principales de la cytotoxicité du TMZ dans ces cellules. Néanmoins il est possible que les alkylations en N<sup>7</sup> des guanines et en N<sup>3</sup> des adénines induisent des cassures simple brin dans la lignée U251 car celle-ci montre un clivage de PARP après traitement au TMZ (non montré). PARP reconnaît les cassures simple brin et initialise le processus de réparation par excision de base (BER) (Almeida et Sobol, 2007). Il a déjà été montré que la combinaison du TMZ avec des inhibiteurs de PARP augmente la cytotoxicité du TMZ dans des modèles précliniques de GBMs (Miknyoczki et al., 2003). C'est une stratégie qui peut se montrer prometteuse car elle s'affranchit du statut MGMT des patients cependant des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de PARP sont aujourd'hui largement documentés dans de nombreux cancers.

La lignée U251R rendue résistante au TMZ exprime la MGMT. Au moment de notre découverte une étude a publié des résultats similaires. Les auteurs suggèrent qu'un régime métronomique (doses croissantes répétées) serait approprié pour saturer les quantités de MGMT et rétablir une sensibilité (Pan et al., 2011). Cependant les doses proposées sont éloignées de la réalité clinique (360µM alors que la dose journalière accordée à un adulte est d'environ 100µM). Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de la MGMT notamment la méthylation de son promoteur.

L'expression de la MGMT dans la lignée U251R est présente malgré la forte méthylation du promoteur de son gène. Nous avons utilisé des amorces entourant la séquence

décrite par Esteller *et al.* qui ont démontré que l'inactivation de MGMT par la méthylation de son promoteur est corrélée avec la réponse aux agents alkylants dans le GBM (Esteller et al., 2000). Une étude multicentrique menée par notre laboratoire confirme que le taux de méthylation évalué par PCR semi-quantitative et par pyroséquençage est corrélé avec la survie globale des patients. Cependant l'expression de MGMT évaluée au niveau ARN par RT-QPCR et protéique par immunohistochimie, montrent respectivement peu ou pas de corrélation (Karayan-Tapon *et al.* 2010). Il est probable qu'une déméthylation puisse intervenir sur une autre zone du promoteur, expliquant ainsi la réexpression protéique observée dans la lignée U251R. Notre équipe a déjà montré que l'ajout d'acide folique, un agent méthylant, diminue l'expression de MGMT et sensibilise les tumeurs au TMZ (Cartron et al., 2012; Hervouet et al., 2009). Dès lors il serait intéressant de savoir si une déméthylation spécifique intervient sur le promoteur de MGMT ou bien s'il s'agit d'une déméthylation globale de l'ADN. Dans les deux cas, l'inhibition des acteurs responsables de cette déméthylation serait une stratégie thérapeutique pertinente pour éviter l'apparition d'une résistance par MGMT.

## **2.2 EGFR a-t-il un rôle dans la résistance ? Est-ce qu'un ligand en particulier y est associé ?**

L'EGFR est fortement exprimé dans les lignées U251, U87 et LN18. Cependant seule la lignée sensible U251 présente une augmentation de l'expression d'EGFR observée par RT-QPCR en réponse au TMZ. Ce dernier induit de plus une forte activation du récepteur dans cette lignée. La surexpression et l'activation d'EGFR dans la lignée U251 laissent supposer un rôle dans la résistance au TMZ. Nous ne nous sommes pas aventurés à étudier l'effet de son extinction ou de sa surexpression sur la résistance de la lignée U251 pour confirmer cette hypothèse. L'inhibition d'EGFR entraîne une forte cytotoxicité dans toutes nos lignées. De plus cette cytotoxicité est indépendante de Bax ou de Bak dans la lignée U251, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante en combinaison avec le TMZ.

Nous avons mis en évidence une forte surexpression du HBEGF dans la lignée U251 en réponse au TMZ. Contrairement à nos *a priori* la phosphorylation d'EGFR dans la lignée U251 en réponse au TMZ n'est pas dépendante du HBEGF. On remarque tout de même une légère diminution de la phosphorylation d'EGFR dans la lignée U251-shHBEGF. Nous avons d'ailleurs pu détecter des interactions HBEGF/EGFR par P-LISA dans la lignée U251 72h après traitement au TMZ. Il n'est donc pas exclu que le HBEGF puisse avoir un rôle dans la

phosphorylation d'EGFR. Néanmoins ce rôle est mineur et n'a pas d'effet sur la sensibilité de la lignée U251 au TMZ.

Nos résultats montrent que l'ajout de HBEGF soluble recombinant ou l'inhibition du HBEGF par le CRM197 ou ARN interférant n'ont aucun effet sur la viabilité des cellules U251 traitées au TMZ. Le shedding du proHBEGF en HBEGF soluble est responsable de l'activation d'EGFR en réponse à la chimiothérapie (doxorubicine, SN38, cisplatine) (Wang et al., 2007) et à l'inhibition du protéasome (Sloss et al., 2010). Wang *et al.* montrent par ailleurs que l'inhibition du HBEGF par le CRM197 ou son extinction par ARN interférant empêche la phosphorylation du récepteur et sensibilise les cellules à la chimiothérapie. Au contraire la surexpression du HBEGF protège les cellules de la mort. Dans le cancer ovarien, le CRM197 agit en synergie avec le paclitaxel et induit directement une mortalité cellulaire (Yagi et al., 2009). Le CRM197 n'a pas d'effet synergique avec le TMZ dans nos lignées. Il n'a d'ailleurs aucun effet cytotoxique en agent seul contrairement à l'inhibition d'EGFR. Ces résultats nous ont lentement amenés à considérer un rôle du HBEGF indépendant d'EGFR dans notre modèle.

### **3 Quel est le rôle du HBEGF dans la réponse au TMZ ?**

#### **3.1 Comment le HBEGF influe-t-il sur la dégradation de Mcl-1 ?**

Le résultat principal de ces travaux de thèse restera la mise en évidence de l'implication du HBEGF dans la régulation de la dégradation de Mcl-1 en réponse au TMZ. Mcl-1 est un anti-apoptotique qui, dans les cellules saines, séquestre Bax et plus spécifiquement Bak à la membrane mitochondriale. Comme nous l'avons vu, le TMZ induit une apoptose fortement dépendante de Bak qui passe par la dégradation de Mcl-1. L'extinction du HBEGF ne protège pas les cellules U251 de l'apoptose, malgré le maintien apparent de Mcl-1. La dégradation de Mcl-1 n'est donc pas essentielle au déclenchement du processus apoptotique par le TMZ. Le TMZ induit une surexpression de Noxa qui est retrouvée aussi bien dans les cellules U251 que dans les cellules U251-shHBEGF. De ce fait nous pouvons supposer que malgré sa stabilisation apparente, Mcl-1 est tout de même séquestré par Noxa, ce qui laisse Bak libre d'induire la perméabilisation mitochondriale. On

peut aussi supposer que le HBEGF dégrade la fraction cytoplasmique de Mcl-1 et n'intervient pas sur la fraction mitochondriale. Dans les deux cas, le rôle du HBEGF est restreint à la dégradation de Mcl-1 et n'intervient pas dans l'apoptose. Il est aussi surprenant de voir que le TMZ augmente l'expression de Bak dans les U251-shHBEGF. Le rapport Mcl-1/Bak est alors modifié et la portion de Mcl-1 non dégradé dans les cellules U251-shHBEGF n'est pas suffisant pour empêcher l'activation des caspases dans cette lignée.

La liaison de Noxa avec Mcl-1 est associée à la dégradation de ce dernier par le protéasome. Noxa favorise en effet la polyubiquitination de Mcl-1 par l'E3 ligase MULE (Zhong et al., 2005) et diminue les interactions entre Mcl-1 et la déubiquitinase USP9X (Gomez-Bougie et al., 2011). Le TMZ induit une diminution des interactions USP9X/Mcl-1 dans la lignée U251 mais pas dans la lignée U251-shHBEGF. Le maintien de l'expression de Mcl-1 semble donc corrélé avec son interaction avec USP9X. Le niveau protéique d'USP9X diminue en réponse au TMZ dans la lignée U251 mais ne varie pas lorsque le HBEGF est invalidé.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence des interactions directes entre HBEGF et USP9X et avons donc cherché d'autres partenaires. Dans la littérature, seul BAG-1, une protéine cochaperonne, a été identifiée comme partenaire direct du proHBEGF par la technique du double hybride (Lin et al., 2001a). Le TMZ augmente les interactions entre le HBEGF et BAG-1 dans la lignée U251. Dans les leucémies myéloïdes, l'extinction de BAG-1 entraîne une diminution de Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et de phospho ER (Aveic et al., 2011). Ces auteurs montrent par ailleurs que BAG-1 maintient directement l'expression de Bcl-2 et protège Mcl-1 de sa dégradation par le protéasome en contrôlant l'expression d'USP9X et identifient ce dernier comme nouveau partenaire de BAG-1. L'interaction entre le HBEGF et BAG-1 est une explication tangible aux variations de l'expression d'USP9X observée après traitement au TMZ et donne une explication au rôle de HBEGF dans la dégradation de Mcl-1. Pour élucider ce mécanisme, il reste à confirmer l'existence d'interactions entre BAG-1 et USP9X dans notre modèle. Une inhibition de BAG-1 par ARN interférant pourrait empêcher la dégradation de Mcl-1 dans la lignée U251 ou bien rétablir cette dégradation dans la lignée U251-shHBEGF. De façon similaire, l'inhibition d'USP9X peut potentiellement sensibiliser les cellules au TMZ. Cependant USP9X interagit avec d'autres protéines impliquées dans des voies de signalisation importantes telles que  $\beta$ -caténine ou SMAD4 (promotion de la voie du TGF- $\beta$ ) (Sacco et al., 2010).

D'autres mécanismes peuvent entraîner la dégradation de Mcl-1, comme par exemple sa phosphorylation par la kinase GSK3 sur la sérine 159 (Maurer et al., 2006). GSK3 est activée par MAPK alors qu'elle est inhibée par AKT (Maurer et al., 2006). Dès lors la régulation de Mcl-1 peut être modulée via les récepteurs à tyrosine kinase tels qu'EGFR. Le TMZ induit une phosphorylation de la tyrosine 1068 d'EGFR qui est impliquée dans l'amarrage de la protéine adaptatrice GRB2/Sos ce qui active la voie des Ras/MAPK. EGFR peut donc potentiellement déréguler Mcl-1 par cette voie. Cependant EGFR est phosphorylé dans les cellules U251-shHBEGF dans lesquelles Mcl-1 n'est pas dégradé. De plus la mort induite par l'inhibition de la tyrosine kinase d'EGFR ne conduit pas à la dégradation de Mcl-1 dans la lignée U251 et agit donc par d'autres mécanismes.

Mcl-1 peut aussi être dégradé par le protéasome de manière indépendante de l'ubiquitinylation (Stewart et al., 2010). Il existe donc des voies de secours permettant la dégradation de Mcl-1. Une étude récente montre que l'adressage à la mitochondrie de Mcl-1 est requis pour une dégradation indépendante du protéasome (Mills et al., 2012). C'est-à-dire que même lorsque le protéasome est inhibé, Mcl-1 (et non d'autres protéines à demi-vie équivalente utilisées comme contrôle dans l'étude) peut subir une protéolyse une fois qu'il est importé à la mitochondrie. Ce phénomène est concurrent avec la dépolarisation de la paroi mitochondriale. Cela ne semble pas être le cas dans les cellules U251 puisque l'inhibition du protéasome par le MG132 empêche totalement la dégradation de Mcl-1.

### **3.2 Quel est le rôle du HBEGF nucléaire ?**

Une étude a montré que la translocation du proHBEGF au noyau était corrélée avec un mauvais pronostic dans les carcinomes transitionnels de la vessie (Adam et al., 2003). Nous voyons une localisation du HBEGF dans le noyau par P-LISA dans les cellules U251 traitées au TMZ et non dans les cellules U87. Pour confirmer ce résultat, nous avons tenté d'appliquer notre méthode de dosage par ELISA sur des fractionnements nucléaires mais sans succès. Le HBEGF présente une très forte homologie avec un autre ligand d'EGFR, l'amphiréguline. Il a été proposé que la localisation nucléaire de l'amphiréguline soit un régulateur de la prolifération indépendant d'EGFR (Nylander et al., 1998). EGFR est lui-même capable de se rendre au noyau et on peut supposer que le proHBEGF nucléaire puisse interagir avec lui. Une autre alternative est que le proHBEGF interagisse avec d'autres partenaires pour accomplir ses effets fonctionnels. L'amphiréguline est capable de se lier directement à l'ADN ce qui suggère que ces facteurs peuvent jouer un rôle dans la régulation de gènes directement

au niveau transcriptionnel (Modrell et al., 1992). La partie C-terminale du HBEGF est capable de subir une translocation au noyau où il induit l'export nucléaire du répresseur transcriptionnel PLZF. PLZF est un répresseur transcriptionnel séquence-spécifique et inhibiteur de la progression dans le cycle cellulaire. Il achève ses effets grâce à un domaine à doigt de zinc sur les promoteurs de gènes tels que la cycline A. Son export du noyau empêche son action inhibitrice et promeut la progression dans le cycle (Nanba et al., 2003). HBEGF-CTF agit aussi sur un autre répresseur de la transcription, BCL6, qu'il inhibe en induisant sa dégradation (Kinugasa et al., 2007).

Une cible potentielle du HBEGF pourrait être la survivine. En effet, lorsque le HBEGF est invalidé, le TMZ entraîne une diminution de la survivine dans la lignée U251. Par ailleurs la lignée U251R présente une augmentation de son niveau basal de survivine et de HBEGF comparativement à la lignée d'origine. La survivine est une petite protéine qui possède un double rôle, l'un dans la régulation du cycle cellulaire et de la réparation des dommages de l'ADN et l'autre dans la régulation de la mort. Ces fonctions essentielles aux cellules cancéreuses confèrent à la survivine de multiples propriétés oncogéniques. Le fait que p53 soit muté dans la lignée U251 peut être une explication à sa dérégulation. D'autre part, la survivine est induite par de nombreuses voies de signalisation (STAT-3, PI3K, NFκB). La survivine est un régulateur important de la mitose et intervient aussi dans la transition G1/S qu'elle est capable de forcer en cas de dérégulation. La survivine est capable d'inhiber les caspases de façon indirecte notamment en favorisant l'activité anti-apoptotique de XIAP. Enfin la survivine pourrait réguler les processus de réparation de l'ADN et participer ainsi à la survie. La survivine stimule la réparation des cassures double brin via une interaction directe avec DNA-PK (Roos and Kaina, 2013). Au cours de l'acquisition de la résistance dans la lignée U251R la survivine peut donc jouer un rôle fondamental dans le blocage de l'apoptose et la stimulation de la réparation.

### **3.3 Quelle est la relation entre l'apparition des dommages double brin et le HBEGF ?**

Il existe un parallèle entre l'expression du HBEGF et l'apparition des foci  $\gamma$ H2AX dans les lignées U251 et U87.  $\gamma$ H2AX n'est pas activée dans les lignées LN18 et U251R, ce qui est logique car elles expriment la MGMT qui répare les méthylations avant que celles-ci ne causent des dommages double brin de l'ADN. Ces deux lignées sont toutefois sensibles à l'irradiation tout comme la lignée U251. Seule la lignée U87 présente une résistance à la fois

au TMZ et à l'irradiation. La lignée U87 possède un p53 sauvage, ce qui suggère qu'elle devrait être capable de déclencher les voies apoptotiques en réponse aux lésions de l'ADN. Il a récemment été montré que l'extinction de p53 sauvage dans la lignée U87 n'a aucun effet sur sa chimiorésistance (Wang et al., 2012). On peut donc supposer que p53 n'est pas essentiel à la signalisation des dommages de l'ADN dans la lignée U87. Dans cette même étude, que l'extinction de p53 dans des lignées de GBM mutées pour cette protéine diminue l'expression de MGMT et sensibilise les cellules au TMZ. Il existerait donc une relation entre p53 muté et l'expression de MGMT que l'on pourrait vérifier dans notre modèle en regardant l'impact de l'inactivation du p53 muté de la lignée U251R sur l'expression de MGMT.

L'inhibition de DNA-PKcs par le NU7026 augmente la cytotoxicité du TMZ dans la lignée U87 et non dans la lignée U251. L'activité de DNA-PKcs peut être directement stimulée par une translocation nucléaire d'EGFR (Brand et al., 2013). La lignée U87 exprimant fortement l'EGFR pourrait donc s'appuyer sur cette signalisation nucléaire pour réparer efficacement les cassures induites par le TMZ. La DNA-PK est de la même famille qu'ATM et ATR mais n'a pas de rôle décisionnel sur le devenir de la cellule (réparation, déclenchement de l'apoptose, activation du point de contrôle). DNA-PK régule la NHEJ qui est une voie de réparation des cassures double brin plus rapide que la recombinaison homologue. L'utilisation préférentielle de cette voie de réparation par la lignée U87 expliquerait pourquoi, à dose équivalente de TMZ, elle présente moins de dommages double brin que la lignée U251 bien qu'elle n'exprime pas la MGMT. Nous n'avons pas observé de dégradation de Mcl-1 dans la lignée U87 traitée au TMZ. Il serait intéressant de regarder si un co-traitement au NU7026 et au TMZ induit une dégradation de Mcl-1. En effet la lignée U87 présente déjà une surexpression du HBEGF en réponse au TMZ qui est moindre que celle observée dans la lignée U251. Une surexpression du HBEGF pourrait sensibiliser la lignée U87 à l'induction de l'apoptose par le TMZ.

L'expression de la MGMT à elle seule confère une résistance au TMZ en prévenant l'apparition des dommages à l'ADN dans la lignée U251. La saturation de l'enzyme MGMT dans la lignée U251R induit une réapparition des foci  $\gamma$ H2AX. Celle-ci est accompagnée d'une surexpression du HBEGF ce qui établit encore une fois une corrélation entre la signalisation des cassures double brins de l'ADN et l'expression du HBEGF. Le nombre de foci  $\gamma$ H2AX diminue progressivement dans les cellules U251 survivantes à 120h après traitement au TMZ. Cela signifie que ces cellules ont réparé les dommages double brin induit par le traitement. À 120h après traitement TMZ, les U251 invalidées pour le HBEGF

---

présentent encore une activation de H2AX et on peut supposer qu'il existe donc un défaut de réparation des dommages dans ces cellules.

Une expérience préliminaire nous montre qu'ATR est phosphorylé dès 48h dans la lignée U251 traitée au TMZ, alors que dans la lignée U251-shHBEGF, ATR n'est phosphorylé qu'à partir de 72h. L'implication du HBEGF dans la phosphorylation de cette kinase reste un mystère et nous ne pouvons qu'établir des suppositions. La lignée U251 n'étant pas sensible à l'inhibition de DNA-PK, elle utilise donc un système de réparation plus lent. Si le HBEGF est impliqué dans l'activation d'ATR, son extinction entrainerait un retard dans la signalisation des dommages et dans l'activation de  $\gamma$ H2AX, ce qui *in fine* retarde la réparation. Le HBEGF régule la dégradation de Mcl-1 or Mcl-1 est aussi impliqué dans la réponse précoce aux dommages de l'ADN (Zhan et al., 1997). Il est en effet augmenté préférentiellement dans les cellules sensibles aux dommages de l'ADN et ce de manière indépendante de p53. Il a été aussi montré qu'une forme nucléaire de Mcl-1 interviendrait dans la phosphorylation de Chk1 par ATR, or Chk1 est responsable de la phosphorylation de H2AX (Jamil et al., 2008). L'effet du HBEGF passe par son interaction avec BAG-1 qui à son tour régule le niveau protéique de la déubiquitine USP9X. Il est possible que d'autres membres de la famille des ubiquitine ligases puissent être régulés par BAG-1. De manière intéressante il a récemment été montré que l'ubiquitine ligase RNF8 était essentielle au recrutement des protéines de réparation 53BP1 et BRCA1/BARD1 au site de phosphorylation de  $\gamma$ H2AX (Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007). De plus, le recrutement de MCPH1 par  $\gamma$ H2AX permet un contrôle du checkpoint du cycle cellulaire via une interaction avec ATR et ATM (Alderton et al., 2006; Wood et al., 2007). L'absence du HBEGF et une diminution de l'activité de BAG-1 provoquerait donc un défaut de recrutement de ces protéines de réparation ainsi qu'un défaut de phosphorylation d'ATR. Ainsi ce modèle hypothétique expliquerait à la fois, le défaut de réparation et de phosphorylation d'ATR observés dans la lignée U251.

## 4 Conclusion générale

Le TMZ reste pour le moment la meilleure option thérapeutique dans le traitement des GBMs. Les résurgences sont inévitables même chez les patients traités par radio- et chimiothérapie. Nos résultats montrent que l'expression de l'enzyme MGMT est un élément primordial dans la résistance au TMZ. Cette étude a aussi montré l'importance de l'axe Mcl-1/Bak dans l'apoptose induite par le TMZ. Elle a pu mettre en évidence l'implication du HBEGF dans la régulation de la dégradation de Mcl-1. L'identification de ces mécanismes moléculaires apporte donc de nouvelles pistes de réflexion pour l'amélioration de l'efficacité du TMZ. Elle ouvre aussi de nombreuses questions quant au rôle du HBEGF en réponse au traitement.

Les relations entre la signalisation des dommages de l'ADN et la surexpression du HBEGF sont encore à élucider. Dans notre modèle le HBEGF pourrait servir de pont entre la signalisation des dommages et l'induction de l'apoptose. Outre ce rôle particulier du HBEGF, qui se déroule indépendamment de son récepteur, l'EGFR a sans doute en parallèle une importance capitale dans les mécanismes de résistance et de tumorigenèse.

L'échec des inhibiteurs d'EGFR dans le GBM montre que malgré son intérêt indiscutable en tant que cible thérapeutique, de nombreux efforts restent à faire pour aboutir à une thérapie ciblée efficace.

# **BIBLIOGRAPHIE**

---

**-A-**

Adam, R.M., Borer, J.G., Williams, J., Eastham, J.A., Loughlin, K.R., and Freeman, M.R. (1999). Amphiregulin is coordinately expressed with heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the interstitial smooth muscle of the human prostate. *Endocrinology* *140*, 5866–5875.

Adam, R.M., Danciu, T., McLellan, D.L., Borer, J.G., Lin, J., Zurakowski, D., Weinstein, M.H., Rajjayabun, P.H., Mellon, J.K., and Freeman, M.R. (2003). A nuclear form of the heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor precursor is a feature of aggressive transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* *63*, 484–490.

Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., and Canman, C.E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* *60*, 5934–5936.

Akgul, C. (2009). Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 1326–1336.

Alderton, G.K., Galbiati, L., Griffith, E., Surinya, K.H., Neitzel, H., Jackson, A.P., Jeggo, P.A., and O’Driscoll, M. (2006). Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. *Nat. Cell Biol.* *8*, 725–733.

Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2007). Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol. Cell* *26*, 301–310.

Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* *276*, 6063–6073.

Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair* *6*, 695–711.

Anvekar, R.A., Ascioffa, J.J., Missert, D.J., and Chipuk, J.E. (2011). Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Front. Oncol.* *1*.

Aveic, S., Pigazzi, M., and Basso, G. (2011). BAG1: The Guardian of Anti-Apoptotic Proteins in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE* *6*, e26097.

Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L., and Loiseau, H. (2010). [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie.* *56*, 433–440.

Baritaud, M., Cabon, L., Delavallée, L., Galán-Malo, P., Gilles, M.-E., Brunelle-Navas, M.-N., and Susin, S.A. (2012). AIF-mediated caspase-independent necroptosis requires ATM and DNA-PK-induced histone H2AX Ser139 phosphorylation. *Cell Death Dis.* *3*, e390.

Batzer, A.G., Rotin, D., Ureña, J.M., Skolnik, E.Y., and Schlessinger, J. (1994). Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 5192–5201.

- Van den Bent, M.J., Snijders, T.J., and Bromberg, J.E.C. (2012). Current treatment of low grade gliomas. *Memo* 5, 223–227.
- Bertin-Ciftci, J., Barré, B., Le Pen, J., Maillet, L., Couriaud, C., Juin, P., and Braun, F. (2013). pRb/E2F-1-mediated caspase-dependent induction of Noxa amplifies the apoptotic effects of the Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737. *Cell Death Differ.* 20, 755–764.
- Bingle, C.D., Craig, R.W., Swales, B.M., Singleton, V., Zhou, P., and Whyte, M.K. (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.
- De Bonis, P., Fiorentino, A., Anile, C., Balducci, M., Pompucci, A., Chiesa, S., Sica, G., Lama, G., Maira, G., and Mangiola, A. (2012). The impact of repeated surgery and adjuvant therapy on survival for patients with recurrent glioblastoma. *Clin. Neurol. Neurosurg.*
- Van den Bosch, M., Bree, R.T., and Lowndes, N.F. (2003). The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep.* 4, 844–849.
- Brand, T.M., Iida, M., Luthar, N., Starr, M.M., Huppert, E.J., and Wheeler, D.L. (2013). Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*
- Brown, P.D., Krishnan, S., Sarkaria, J.N., Wu, W., Jaeckle, K.A., Uhm, J.H., Geoffroy, F.J., Arusell, R., Kitange, G., Jenkins, R.B., et al. (2008). Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 5603–5609.
- Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., and Lo, H.-W. (2011). EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocation: A potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Mol. Cancer* 10, 26.
- Caporali, S., Falcinelli, S., Starace, G., Russo, M.T., Bonmassar, E., Jiricny, J., and D’Atri, S. (2004). DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol. Pharmacol.* 66, 478–491.
- Cartron, P.-F., Oliver, L., Martin, S., Moreau, C., LeCabelle, M.-T., Jezequel, P., Meflah, K., and Vallette, F.M. (2002). The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum. Mol. Genet.* 11, 675–687.
- Cartron, P.-F., Hervouet, E., Debien, E., Olivier, C., Pouliquen, D., Menanteau, J., Loussouarn, D., Martin, S.A., Campone, M., and Vallette, F.M. (2012). Folate supplementation limits the tumorigenesis in rodent models of gliomagenesis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* 48, 2431–2441.
- Casalini, P., Iorio, M.V., Galmozzi, E., and Ménard, S. (2004). Role of HER receptors family in development and differentiation. *J. Cell. Physiol.* 200, 343–350.
- Chaichana, K.L., Zadnik, P., Weingart, J.D., Olivi, A., Gallia, G.L., Blakeley, J., Lim, M., Brem, H., and Quiñones-Hinojosa, A. (2012). Multiple resections for patients with glioblastoma: prolonging survival. *J. Neurosurg.*

- Chapman, J.R., and Jackson, S.P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep.* *9*, 795–801.
- Chen, C., Xu, T., Lu, Y., Chen, J., and Wu, S. (2012). The efficacy of temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.*
- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* *17*, 393–403.
- Cho, H.-S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., Jr, and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* *421*, 756–760.
- Chowdhury, D., Keogh, M.-C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* *20*, 801–809.
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 616–627.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 505–516.
- Critchlow, S.E., and Jackson, S.P. (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 394–398.
- Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D., and White, E. (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev.* *17*, 2922–2932.
- Darkes M.J.M., Plosker G.L., and Jarvis B. (2002). Temozolomide: A Review of its Use in the Treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and Other Advanced Cancers. *Am. J. Cancer* *1*, 55–80.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* *379*, 557–560.
- Demory, M.L., Boerner, J.L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., and Parsons, S.J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J. Biol. Chem.* *284*, 36592–36604.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol. CB* *10*, 1201–1204.
- Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *280*, 31182–31189.

- Dittmann, K., Mayer, C., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2008). Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol. Cancer* 7, 69.
- Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R., and Craig, R.W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* 23, 5301–5315.
- Dreier, A., Barth, S., Goswami, A., and Weis, J. (2012). Cetuximab induces mitochondrial translocation of EGFRvIII, but not EGFR: involvement of mitochondria in tumor drug resistance? *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 33, 85–94.
- Dresemann, G. (2010). Temozolomide in malignant glioma. *OncoTargets Ther.* 3, 139–146.
- Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M., and Modrich, P. (1996). Human MutS $\alpha$  recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6443–6447.
- Duursma, A.M., Driscoll, R., Elias, J.E., and Cimprich, K.A. (2013). A role for the MRN complex in ATR activation via TOPBP1 recruitment. *Mol. Cell* 50, 116–122.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424.
- Eberle, A., Reinehr, R., Becker, S., and Häussinger, D. (2005). Fluorescence resonance energy transfer analysis of proapoptotic CD95-EGF receptor interactions in Huh7 cells. *Hepatology* 41, 315–326.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Elenius, K., Paul, S., Allison, G., Sun, J., and Klagsbrun, M. (1997). Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *EMBO J.* 16, 1268–1278.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 343, 1350–1354.
- Fan, Q.-W., Cheng, C.K., Gustafson, W.C., Charron, E., Zipper, P., Wong, R.A., Chen, J., Lau, J., Knobbe-Thomsen, C., Weller, M., et al. (2013). EGFR Phosphorylates Tumor-Derived EGFRvIII Driving STAT3/5 and Progression in Glioblastoma. *Cancer Cell* 24, 438–449.
- Fels, C., Schäfer, C., Hüppe, B., Bahn, H., Heidecke, V., Kramm, C.M., Lautenschläger, C., and Rainov, N.G. (2000). Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. *J. Neurooncol.* 48, 207–216.
- Figuroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations

result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18, 553–567.

Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A., and Ullrich, A. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1203–1208.

Franceschi, E., Cavallo, G., Lonardi, S., Magrini, E., Tosoni, A., Grosso, D., Scopece, L., Blatt, V., Urbini, B., Pession, A., et al. (2007). Gefitinib in patients with progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Br. J. Cancer* 96, 1047–1051.

Frank Marko, N., Weil, R.J., Schroder, J.L., and Sawaya, R. (2013). 148 Extent of resection of glioblastoma revisited: personalized survival modeling facilitates more accurate individualized survival prediction and supports a “maximum safe resection” approach surgery. *Neurosurgery* 60 Suppl 1, 169.

Fu, D., Calvo, J.A., and Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer* 12, 104–120.

Fu, S. I., Bottoli, I., Goller, M., and Vogt, P.K. (1999). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, a v-Jun target gene, induces oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5716–5721.

George, A.J., Thomas, W.G., and Hannan, R.D. (2010). The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat. Rev. Cancer* 10, 745–759.

Giri, D.K., Ali-Seyed, M., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Ling, P., Bartholomeusz, G., Wang, S.-C., and Hung, M.-C. (2005). Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol. Cell. Biol.* 25, 11005–11018.

Gomez-Bougie, P., Ménoret, E., Juin, P., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. (2011). Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 460–464.

Gottlieb, T.M., Leal, J.F.M., Seger, R., Taya, Y., and Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299–1303.

Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 20, 1594–1600.

Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X., and Dunphy, W.G. (2000). Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 14, 2745–2756.

Haas-Kogan, D.A., Prados, M.D., Tihan, T., Eberhard, D.A., Jelluma, N., Arvold, N.D., Baumber, R., Lamborn, K.R., Kapadia, A., Malec, M., et al. (2005). Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 880–887.

- Harris, R.C., Chung, E., and Coffey, R.J. (2003). EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* 284, 2–13.
- Hartman, Z., Zhao, H., and Agazie, Y.M. (2012). HER2 stabilizes EGFR and itself by altering autophosphorylation patterns in a manner that overcomes regulatory mechanisms and promotes proliferative and transformation signaling. *Oncogene*.
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Bady, P., Kamoshima, Y., Kouwenhoven, M.C.M., Delorenzi, M., Lambiv, W.L., Hamou, M.-F., Matter, M.S., Koch, A., et al. (2011). Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib--a phase II trial. *Mol. Cancer Ther.* 10, 1102–1112.
- Herbst, R.S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 21–26.
- Hervouet, E., Debien, E., Champion, L., Charbord, J., Menanteau, J., Vallette, F.M., and Cartron, P.-F. (2009). Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3519–3529.
- Higashiyama, S., and Nanba, D. (2005). ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 110–117.
- Hill, R., and Lee, P.W.K. (2010). The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 3460–3469.
- Hoshino, M., Fukui, H., Ono, Y., Sekikawa, A., Ichikawa, K., Tomita, S., Imai, Y., Imura, J., Hiraishi, H., and Fujimori, T. (2007). Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* 74, 15–21.
- Hou, L.C., Veeravagu, A., Hsu, A.R., and Tse, V.C.K. (2006). Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg. Focus* 20, E5.
- Hsieh, A.C., and Moasser, M.M. (2007). Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br. J. Cancer* 97, 453–457.
- Hsu, S.-C., and Hung, M.-C. (2007). Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family. *J. Biol. Chem.* 282, 10432–10440.
- Huang, W.-C., Chen, Y.-J., Li, L.-Y., Wei, Y.-L., Hsu, S.-C., Tsai, S.-L., Chiu, P.-C., Huang, W.-P., Wang, Y.-N., Chen, C.-H., et al. (2011). Nuclear Translocation of Epidermal Growth Factor Receptor by Akt-dependent Phosphorylation Enhances Breast Cancer-resistant Protein Expression in Gefitinib-resistant Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 20558–20568.
- De la Iglesia, N., Konopka, G., Puram, S.V., Chan, J.A., Bachoo, R.M., You, M.J., Levy, D.E., Depinho, R.A., and Bonni, A. (2008). Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes Dev.* 22, 449–462.
- Ito, Y., Takeda, T., Higashiyama, S., Sakon, M., Wakasa, K.I., Tsujimoto, M., Monden, M., and Matsuura, N. (2001a). Expression of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Oncol. Rep.* 8, 903–907.

- Ito, Y., Higashiyama, S., Takeda, T., Yamamoto, Y., Wakasa, K.I., and Matsuura, N. (2001b). Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in pancreatic adenocarcinoma. *Int. J. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol.* *29*, 47–52.
- Itoh, Y., Joh, T., Tanida, S., Sasaki, M., Kataoka, H., Itoh, K., Oshima, T., Ogasawara, N., Togawa, S., Wada, T., et al. (2005). IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* *29*, 275–282.
- Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., et al. (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3221–3226.
- Jamil, S., Mojtavavi, S., Hojabrpour, P., Cheah, S., and Duronio, V. (2008). An Essential Role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3212–3220.
- Jänicke, R.U., Sohn, D., and Schulze-Osthoff, K. (2008). The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ.* *15*, 959–976.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* *8*, 37–45.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 455–465.
- Kanzawa, T., Germano, I.M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., and Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* *11*, 448–457.
- Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* *21*, 1621–1635.
- Karayan-Tapon, L., Quillien, V., Guilhot, J., Wager, M., Fromont, G., Saikali, S., Etcheverry, A., Hamlat, A., Loussouarn, D., Campion, L., et al. (2010). Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J. Neurooncol.* *97*, 311–322.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239.
- Kinugasa, Y., Hieda, M., Hori, M., and Higashiyama, S. (2007). The carboxyl-terminal fragment of pro-HB-EGF reverses Bcl6-mediated gene repression. *J. Biol. Chem.* *282*, 14797–14806.
- Knizhnik, A.V., Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K.-H., Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PloS One* *8*, e55665.

- Kodama, T., Ikeda, E., Okada, A., Ohtsuka, T., Shimoda, M., Shiomi, T., Yoshida, K., Nakada, M., Ohuchi, E., and Okada, Y. (2004). ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am. J. Pathol.* *165*, 1743–1753.
- Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., et al. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* *318*, 1637–1640.
- Kriegs, M., Kasten-Pisula, U., Rieckmann, T., Holst, K., Saker, J., Dahm-Daphi, J., and Dikomey, E. (2010). The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair* *9*, 889–897.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* *172*, 823–834.
- Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., and Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *12*, 887–896.
- Landau, M., Fleishman, S.J., and Ben-Tal, N. (2004). A putative mechanism for downregulation of the catalytic activity of the EGF receptor via direct contact between its kinase and C-terminal domains. *Struct. Lond. Engl.* *12*, 2265–2275.
- Latha, K., Li, M., Chumbalkar, V., Gururaj, A., Hwang, Y., Dakeng, S., Sawaya, R., Aldape, K., Cavenee, W.K., Bogler, O., et al. (2013). Nuclear EGFRvIII-STAT5b complex contributes to glioblastoma cell survival by direct activation of the Bcl-XL promoter. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *132*, 509–520.
- Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J. Biol. Chem.* *282*, 28036–28044.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* *2*, 183–192.
- Leung, L., Mok, T.S.K., and Loong, H. (2012). Combining chemotherapy with epidermal growth factor receptor inhibition in advanced non-small cell lung cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* *4*, 173–181.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27–42.
- Li, C., Iida, M., Dunn, E.F., Ghia, A.J., and Wheeler, D.L. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* *28*, 3801–3813.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491–501.

- Li, L., Chakraborty, S., Yang, C.-R., Hatanpaa, K.J., CIPHER, D.J., Puliappadamba, V.T., Rehman, A., Jiwani, A.J., Mickey, B., Madden, C., et al. (2013). An EGFR wild type-EGFRvIII-HB-EGF feed-forward loop regulates the activation of EGFRvIII. *Oncogene*.
- Liccardi, G., Hartley, J.A., and Hochhauser, D. (2011). EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res.* *71*, 1103–1114.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 181–211.
- Liebmann, C. (2001). Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell. Signal.* *13*, 777–785.
- Lin, J., Hutchinson, L., Gaston, S.M., Raab, G., and Freeman, M.R. (2001a). BAG-1 is a novel cytoplasmic binding partner of the membrane form of heparin-binding EGF-like growth factor: a unique role for proHB-EGF in cell survival regulation. *J. Biol. Chem.* *276*, 30127–30132.
- Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., and Hung, M.C. (2001b). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* *3*, 802–808.
- Lo, H.-W., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Huang, S.-F., and Hung, M.-C. (2005). Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res.* *65*, 338–348.
- Lo, H.-W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S.-C., and Hung, M.-C. (2006). Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J. Cell. Biochem.* *98*, 1570–1583.
- Lo, H.-W., Cao, X., Zhu, H., and Ali-Osman, F. (2010). Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Mol. Cancer Res. MCR* *8*, 232–245.
- Loew, S., Schmidt, U., Unterberg, A., and Halatsch, M.-E. (2009). The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms. *Anticancer Agents Med. Chem.* *9*, 703–715.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *114*, 97–109.
- Luo, S., Garcia-Arencibia, M., Zhao, R., Puri, C., Toh, P.P.C., Sadiq, O., and Rubinsztein, D.C. (2012). Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules. *Mol. Cell* *47*, 359–370.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* *131*, 887–900.

- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., et al. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* *26*, 2527–2539.
- Manero, F., Gautier, F., Gallenne, T., Cauquil, N., Grée, D., Cartron, P.-F., Geneste, O., Grée, R., Vallette, F.M., and Juin, P. (2006). The small organic compound HA14-1 prevents Bcl-2 interaction with Bax to sensitize malignant glioma cells to induction of cell death. *Cancer Res.* *66*, 2757–2764.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair* *7*, 1765–1771.
- Marchesi, F., Turriziani, M., Tortorelli, G., Avvisati, G., Torino, F., and De Vecchis, L. (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* *56*, 275–287.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007a). Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 961–967.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007b). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* *21*, 1367–1381.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* *316*, 1160–1166.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol. Cell* *21*, 749–760.
- McCarthy, S.A., Samuels, M.L., Pritchard, C.A., Abraham, J.A., and McMahon, M. (1995). Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes. *Genes Dev.* *9*, 1953–1964.
- McDonald, F.E., Ironside, J.W., Gregor, A., Wyatt, B., Stewart, M., Rye, R., Adams, J., and Potts, H.W.W. (2002). The prognostic influence of bcl-2 in malignant glioma. *Br. J. Cancer* *86*, 1899–1904.
- Mérino, D., Giam, M., Hughes, P.D., Siggs, O.M., Heger, K., O'Reilly, L.A., Adams, J.M., Strasser, A., Lee, E.F., Fairlie, W.D., et al. (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J. Cell Biol.* *186*, 355–362.
- Miknyoczki, S.J., Jones-Bolin, S., Pritchard, S., Hunter, K., Zhao, H., Wan, W., Ator, M., Bihovsky, R., Hudkins, R., Chatterjee, S., et al. (2003). Chemopotential of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* *2*, 371–382.

- Mills, J.R., Malina, A., and Pelletier, J. (2012). Inhibiting mitochondrial-dependent proteolysis of Mcl-1 promotes resistance to DNA damage. *Cell Cycle Georget. Tex* 11, 88–98.
- Miyamoto, S., Hirata, M., Yamazaki, A., Kageyama, T., Hasuwa, H., Mizushima, H., Tanaka, Y., Yagi, H., Sonoda, K., Kai, M., et al. (2004). Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res.* 64, 5720–5727.
- Miyoshi, E., Higashiyama, S., Nakagawa, T., Hayashi, N., and Taniguchi, N. (1997). Membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor acts as a tumor survival factor in a hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* 272, 14349–14355.
- Mochizuki, S., and Okada, Y. (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98, 621–628.
- Modrell, B., McDonald, V.L., and Shoyab, M. (1992). The interaction of amphiregulin with nuclei and putative nuclear localization sequence binding proteins. *Growth Factors Chur Switz.* 7, 305–314.
- Mojas, N., Lopes, M., and Jiricny, J. (2007). Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes Dev.* 21, 3342–3355.
- Morgillo, F., Woo, J.K., Kim, E.S., Hong, W.K., and Lee, H.-Y. (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res.* 66, 10100–10111.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26, 6133–6140.
- Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W.L., Shay, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Regli, L., Wick, W., Kouwenhoven, M.C.M., et al. (2008). Stem cell-related “self-renewal” signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 3015–3024.
- Murphy, K.M., Ranganathan, V., Farnsworth, M.L., Kavallaris, M., and Lock, R.B. (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 7, 102–111.
- Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051–1061.
- Nakada, S., Chen, G.I., Gingras, A.-C., and Durocher, D. (2008). PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep.* 9, 1019–1026.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.

- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.
- Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K., and Higashiyama, S. (2003). Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J. Cell Biol.* *163*, 489–502.
- Neyns, B., Sadones, J., Joosens, E., Bouttens, F., Verbeke, L., Baurain, J.-F., D’Hondt, L., Strauven, T., Chaskis, C., In’t Veld, P., et al. (2009). Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *20*, 1596–1603.
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* *17*, 1475–1486.
- Nolan-Stevaux, O., Truitt, M.C., Pahler, J.C., Olson, P., Guinto, C., Lee, D.C., and Hanahan, D. (2010). Differential contribution to neuroendocrine tumorigenesis of parallel egfr signaling in cancer cells and pericytes. *Genes Cancer* *1*, 125–141.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* *366*, 2–16.
- Nylander, N., Smith, L.T., Underwood, R.A., and Piepkorn, M. (1998). Topography of amphiregulin expression in cultured human keratinocytes: colocalization with the epidermal growth factor receptor and CD44. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *34*, 182–188.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* *288*, 1053–1058.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., et al. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* *110*, 775–787.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am. J. Pathol.* *170*, 1445–1453.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* *100*, 2235–2241.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 764–772.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.-L., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., et al. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* *64*, 6892–6899.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* *19*, 3159–3167.

- Ongusaha, P.P., Kwak, J.C., Zwible, A.J., Macip, S., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Fang, L., and Lee, S.W. (2004). HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* *64*, 5283–5290.
- Pabla, N., Huang, S., Mi, Q.-S., Daniel, R., and Dong, Z. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 6572–6583.
- Pan, Q., Yang, X.-J., Wang, H.-M., Dong, X.-T., Wang, W., Li, Y., and Li, J.-M. (2011). Chemoresistance to Temozolomide in Human Glioma Cell Line U251 is Associated with Increased Activity of O (6)-methylguanine-DNA Methyltransferase and Can be Overcome by Metronomic Temozolomide Regimen. *Cell Biochem. Biophys.*
- Patel, M., Vogelbaum, M.A., Barnett, G.H., Jalali, R., and Ahluwalia, M.S. (2012). Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. *Expert Opin. Investig. Drugs* *21*, 1247–1266.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* *122*, 927–939.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol. CB* *10*, 886–895.
- Pérez-Soler, R., Chachoua, A., Hammond, L.A., Rowinsky, E.K., Huberman, M., Karp, D., Rigas, J., Clark, G.M., Santabárbara, P., and Bonomi, P. (2004). Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *22*, 3238–3247.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, e45.
- Piccione, E.C., Lieu, T.J., Gentile, C.F., Williams, T.R., Connolly, A.J., Godwin, A.K., Koong, A.C., and Wong, A.J. (2012). A novel epidermal growth factor receptor variant lacking multiple domains directly activates transcription and is overexpressed in tumors. *Oncogene* *31*, 2953–2967.
- Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* *284*, 21777–21781.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* *3*, 287–296.
- Quinn, J.A., Jiang, S.X., Reardon, D.A., Desjardins, A., Vredenburgh, J.J., Rich, J.N., Gururangan, S., Friedman, A.H., Bigner, D.D., Sampson, J.H., et al. (2009). Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 1262–1267.
- Raab, G., and Klagsbrun, M. (1997). Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim. Biophys. Acta* *1333*, F179–199.

- Rabik, C.A., Njoku, M.C., and Dolan, M.E. (2006). Inactivation of O6-alkylguanine DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 32, 261–276.
- Raizer, J.J., Abrey, L.E., Lassman, A.B., Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Yung, W.K.A., Gilbert, M.R., Aldape, K.A., Wen, P.Y., et al. (2010). A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro-Oncol.* 12, 95–103.
- Ramnarain, D.B., Park, S., Lee, D.Y., Hatanpaa, K.J., Scoggin, S.O., Otu, H., Libermann, T.A., Raisanen, J.M., Ashfaq, R., Wong, E.T., et al. (2006). Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res.* 66, 867–874.
- Raper, S.E., Burwen, S.J., Barker, M.E., and Jones, A.L. (1987). Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology* 92, 1243–1250.
- Ray, K.C., Blaine, S.A., Washington, M.K., Braun, A.H., Singh, A.B., Harris, R.C., Harding, P.A., Coffey, R.J., and Means, A.L. (2009). Transmembrane and soluble isoforms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor regulate distinct processes in the pancreas. *Gastroenterology* 137, 1785–1794.
- Ray, K.C., Moss, M.E., Franklin, J.L., Weaver, C.J., Higginbotham, J., Song, Y., Revetta, F.L., Blaine, S.A., Bridges, L.R., Guess, K.E., et al. (2013). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor eliminates constraints on activated Kras to promote rapid onset of pancreatic neoplasia. *Oncogene*.
- Ricard, D., Idbaih, A., Ducray, F., Lahutte, M., Hoang-Xuan, K., and Delattre, J.-Y. (2012). Primary brain tumours in adults. *Lancet* 379, 1984–1996.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332, 237–248.
- Sacco, J.J., Coulson, J.M., Clague, M.J., and Urbé, S. (2010). Emerging roles of deubiquitinases in cancer-associated pathways. *IUBMB Life* 62, 140–157.
- Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K., and Berk, B.C. (2001). Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6387–6394.
- Schausberger, E., Eferl, R., Parzefall, W., Chabikovskiy, M., Breit, P., Wagner, E.F., Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., and Chabikovskiy, M. (2003). Induction of DNA synthesis in primary mouse hepatocytes is associated with nuclear pro-transforming growth factor alpha and erbB-1 and is independent of c-jun. *Carcinogenesis* 24, 835–841.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211–225.
- Schneider, M.R., and Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J. Cell. Physiol.* 218, 460–466.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem. FEBS* 254, 439–459.

- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., et al. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* *463*, 103–107.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* *14*, 289–300.
- Shinojima, N., Tada, K., Shiraishi, S., Kamiryo, T., Kochi, M., Nakamura, H., Makino, K., Saya, H., Hirano, H., Kuratsu, J.-I., et al. (2003). Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* *63*, 6962–6970.
- Silke, J., and Meier, P. (2013). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Singh, A.B., Sugimoto, K., and Harris, R.C. (2007). Juxtacrine activation of epidermal growth factor (EGF) receptor by membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor protects epithelial cells from anoikis while maintaining an epithelial phenotype. *J. Biol. Chem.* *282*, 32890–32901.
- Sjöström, S., Andersson, U., Liu, Y., Brännström, T., Broholm, H., Johansen, C., Collatz-Laier, H., Henriksson, R., Bondy, M., and Melin, B. (2010). Genetic variations in EGF and EGFR and glioblastoma outcome. *Neuro-Oncol.* *12*, 815–821.
- Sliwkowski, M.X. (2003). Ready to partner. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 158–159.
- Sloss, C.M., Wang, F., Palladino, M.A., and Cusack, J.C., Jr (2010). Activation of EGFR by proteasome inhibition requires HB-EGF in pancreatic cancer cells. *Oncogene* *29*, 3146–3152.
- Smith, G.C., and Jackson, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* *13*, 916–934.
- Soltoff, S.P., and Cantley, L.C. (1996). p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 563–567.
- Sorensen, B.S., Ornskov, D., and Nexø, E. (2006). The chemotherapeutic agent VP16 increases the stability of HB-EGF mRNA by a mechanism involving the 3'-UTR. *Exp. Cell Res.* *312*, 3651–3658.
- Steele, R., Mott, J.L., and Ray, R.B. (2010). MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes Cancer* *1*, 381–387.
- Stegh, A.H. (2012). Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert Opin. Ther. Targets* *16*, 67–83.
- Stewart, D.P., Koss, B., Bathina, M., Perciavalle, R.M., Bisanz, K., and Opferman, J.T. (2010). Ubiquitin-Independent Degradation of Antiapoptotic MCL-1. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3099–3110.

- Stiff, T., Walker, S.A., Cersaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* *25*, 5775–5782.
- Stragliotto, G., Vega, F., Stasiecki, P., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J.Y. (1996). Multiple infusions of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody (EMD 55,900) in patients with recurrent malignant gliomas. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *32A*, 636–640.
- Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* *30*, 3667–3683.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* *10*, 459–466.
- Tagscherer, K.E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Böck, B.C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O.D., Herold-Mende, C., et al. (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* *27*, 6646–6656.
- Tentori, L., and Graziani, G. (2002). Pharmacological strategies to increase the antitumor activity of methylating agents. *Curr. Med. Chem.* *9*, 1285–1301.
- Thomas, R.L., and Gustafsson, A.B. (2013). MCL1 is critical for mitochondrial function and autophagy in the heart. *Autophagy* *9*.
- Thompson, L.H., and Schild, D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.* *477*, 131–153.
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell. Signal.* *16*, 139–144.
- Tokumaru, S., Higashiyama, S., Endo, T., Nakagawa, T., Miyagawa, J.I., Yamamori, K., Hanakawa, Y., Ohmoto, H., Yoshino, K., Shirakata, Y., et al. (2000). Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J. Cell Biol.* *151*, 209–220.
- Townsend, P.A., Cutress, R.I., Sharp, A., Brimmell, M., and Packham, G. (2003). BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Biochim. Biophys. Acta* *1603*, 83–98.
- Townsend, P.A., Stephanou, A., Packham, G., and Latchman, D.S. (2005). BAG-1: a multifunctional pro-survival molecule. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *37*, 251–259.
- Troiani, T., Martinelli, E., Napolitano, S., Vitagliano, D., Ciuffreda, L.P., Costantino, S., Morgillo, F., Capasso, A., Sforza, V., Nappi, A., et al. (2013). Increased TGF $\alpha$  as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET

interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*

Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L.A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W.M., Lu, C., Ward, P.S., et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483, 479–483.

Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., and Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5276–5287.

Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J.D., Klapper, L.N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B.J., et al. (1997). Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J.* 16, 4938–4950.

Verbeek, B., Southgate, T.D., Gilham, D.E., and Margison, G.P. (2008). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br. Med. Bull.* 85, 17–33.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501.

Vlachostergios, P.J., Hatzidaki, E., and Papandreou, C.N. (2013). MGMT depletion after treatment of glioblastoma cells with temozolomide and O6-benzylguanine implicates NFκB and mutant p53. *Neurol. Res.*

Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P.B., and Elledge, S.J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298, 1435–1438.

Wang, F., Liu, R., Lee, S.W., Sloss, C.M., Couget, J., and Cusack, J.C. (2007). Heparin-binding EGF-like growth factor is an early response gene to chemotherapy and contributes to chemotherapy resistance. *Oncogene* 26, 2006–2016.

Wang, X., Mizushima, H., Adachi, S., Ohishi, M., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2006). Cytoplasmic domain phosphorylation of heparin-binding EGF-like growth factor. *Cell Struct. Funct.* 31, 15–27.

Wang, X., Chen, J.-X., Liu, Y.-H., You, C., and Mao, Q. (2012). Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*

Wang, Y.-N., Yamaguchi, H., Hsu, J.-M., and Hung, M.-C. (2010). Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 29, 3997–4006.

Warren, K.E., Gururangan, S., Geyer, J.R., McLendon, R.E., Poussaint, T.Y., Wallace, D., Balis, F.M., Berg, S.L., Packer, R.J., Goldman, S., et al. (2012). A phase II study of O6-benzylguanine and temozolomide in pediatric patients with recurrent or progressive high-

grade gliomas and brainstem gliomas: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *J. Neurooncol.* *106*, 643–649.

Watanabe, K., Tachibana, O., Sata, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *6*, 217–223; discussion 23–24.

Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* *174*, 1149–1153.

Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* *14*, 2060–2071.

Wersäll, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V.P., von Krusenstjerna, S., Larsson, S., Mellstedt, H., and Boethius, J. (1997). Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *44*, 157–164.

Westphal, M., Ram, Z., Riddle, V., Hilt, D., Bortey, E., and Executive Committee of the Gliadel Study Group (2006). Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir. (Wien)* *148*, 269–275; discussion 275.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 401–410.

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* *19*, 1294–1305.

Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* *315*, 856–859.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* *139*, 1281–1292.

Wood, J.L., Singh, N., Mer, G., and Chen, J. (2007). MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* *282*, 35416–35423.

Xia, W., Wei, Y., Du, Y., Liu, J., Chang, B., Yu, Y.-L., Huo, L.-F., Miller, S., and Hung, M.-C. (2009). Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Mol. Carcinog.* *48*, 610–617.

Yagi, H., Yotsumoto, F., Sonoda, K., Kuroki, M., Mekada, E., and Miyamoto, S. (2009). Synergistic anti-tumor effect of paclitaxel with CRM197, an inhibitor of HB-EGF, in ovarian cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *124*, 1429–1439.

- Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., et al. (2003). Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J. Cell Biol.* *163*, 469–475.
- Yao, T.-P. (2010). The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing. *Genes Cancer* *1*, 779–786.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 127–137.
- Yip, S., Miao, J., Cahill, D.P., Iafrate, A.J., Aldape, K., Nutt, C.L., and Louis, D.N. (2009). MSH6 Mutations Arise in Glioblastomas during Temozolomide Therapy and Mediate Temozolomide Resistance. *Clin. Cancer Res.* *15*, 4622–4629.
- Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2007). Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM. *J. Biol. Chem.* *282*, 17501–17506.
- Yoshida, K., Ozaki, T., Furuya, K., Nakanishi, M., Kikuchi, H., Yamamoto, H., Ono, S., Koda, T., Omura, K., and Nakagawara, A. (2008). ATM-dependent nuclear accumulation of IKK-alpha plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* *27*, 1183–1188.
- Yoshimoto, K., Mizoguchi, M., Hata, N., Murata, H., Hatae, R., Amano, T., Nakamizo, A., and Sasaki, T. (2012). Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Front. Oncol.* *2*, 186.
- Yoshioka, K., Yoshioka, Y., and Hsieh, P. (2006). ATR kinase activation mediated by MutSalph and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol. Cell* *22*, 501–510.
- Yotsumoto, F., Yagi, H., Suzuki, S.O., Oki, E., Tsujioka, H., Hachisuga, T., Sonoda, K., Kawarabayashi, T., Mekada, E., and Miyamoto, S. (2008). Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *365*, 555–561.
- Youle, R.J. (2007). Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science* *315*, 776–777.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 47–59.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* *87*, 619–628.
- Zhan, Q., Bieszcza, C.K., Bae, I., Fornace, A.J., Jr, and Craig, R.W. (1997). Induction of BCL2 family member MCL1 as an early response to DNA damage. *Oncogene* *14*, 1031–1039.

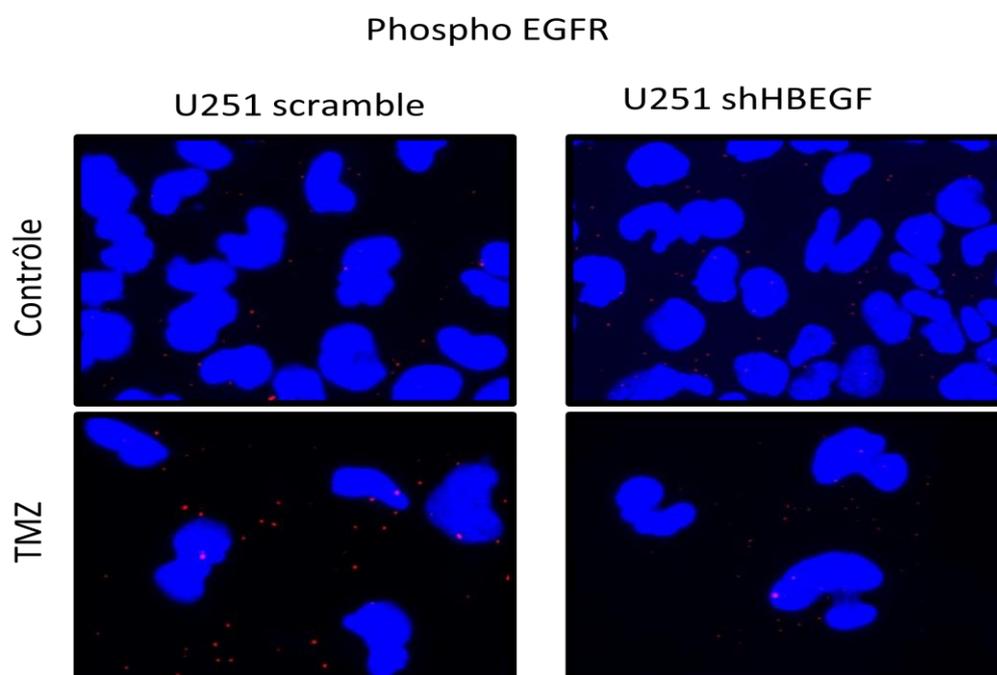
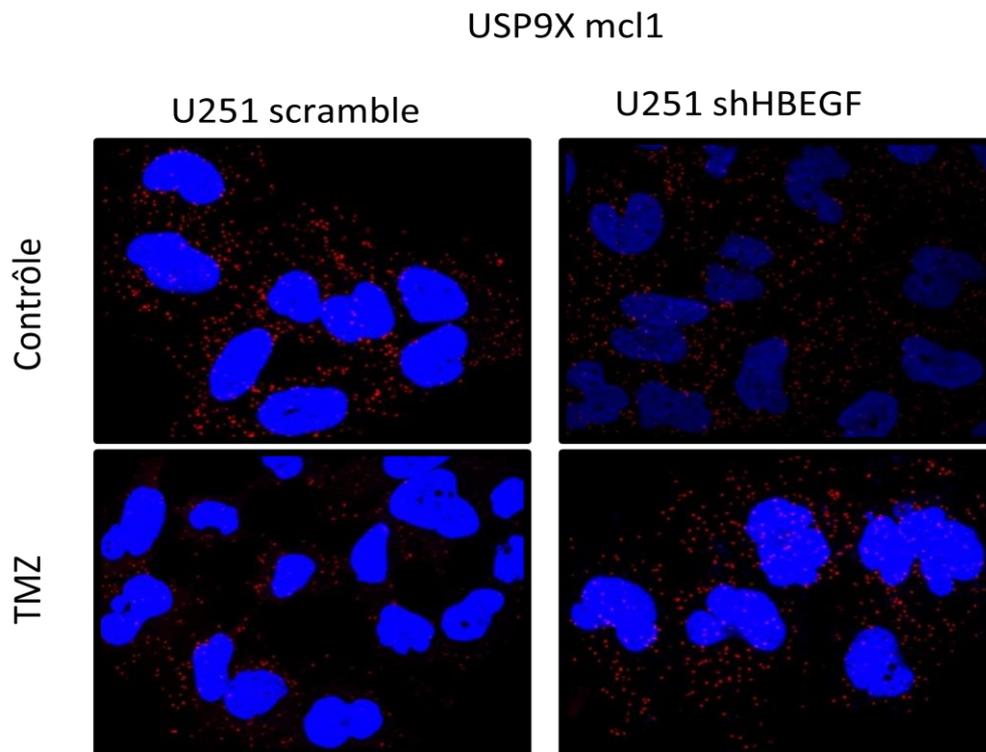
Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* *121*, 1085–1095.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542–1548.

(2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* *455*, 1061–1068.

# **ANNEXE**

## Figures supplémentaires



## Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) est une tumeur cérébrale hautement réfractaire au traitement. Ces dernières années l'utilisation du témozolomide (TMZ), un agent alkylant, couplé à la radiothérapie a permis d'augmenter la survie des patients mais celle-ci reste en moyenne inférieure à un an. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au rôle des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak dans l'apoptose induite par le TMZ. Nous avons pu mettre en évidence un rôle prédominant de l'axe Mcl-1/Bak dans l'induction de l'apoptose en réponse au TMZ.

Le récepteur à tyrosine kinase EGFR est impliqué dans l'oncogenèse des GBMs primaires (35-45% d'amplification) mais aussi dans la résistance au traitement. Dans un second temps nous avons donc analysé l'expression de ligands d'EGFR et mis en évidence une surexpression du HBEGF en réponse au TMZ dans deux lignées n'exprimant pas l'enzyme de réparation MGMT principal facteur de résistance au TMZ. Contre-intuitivement le HBEGF n'a pas de rôle dans la résistance mais s'est révélé être impliqué dans la dégradation de Mcl-1 induite par le TMZ. Ce rôle est indépendant de l'activité de l'EGFR. Nos résultats suggèrent l'implication de la protéine cochaperonne BAG-1 et de la déubiquitineuse USP9X dans ce mécanisme.

Globalement, nos résultats identifient Bak comme l'inducteur principal de l'apoptose après un traitement par le TMZ, proposent un nouveau mécanisme de dégradation de Mcl-1 et mettent en avant un rôle du HBEGF dans la réponse au traitement indépendamment de son récepteur EGFR. De plus, ils identifient BAG-1 comme partenaire privilégié du HBEGF et l'implique dans la régulation de Mcl-1 par sa déubiquitineuse USP9X.

**Mots-clés** : glioblastome, témozolomide, apoptose, Mcl-1, HBEGF

## Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is a cerebral tumor highly refractory to treatment. Over the past years the alkylating agent temozolomide (TMZ) associated with radiotherapy has improved the survival of patients but overall survival is still inferior to one year. During this thesis, we first examine the role of pro-apoptotic proteins Bax and Bak in TMZ-induced apoptosis and highlighted the major role of Mcl-1/Bak axis in TMZ mediated apoptosis.

The tyrosine kinase receptor EGFR is implicated in primary GBMs oncogenesis (35-45% of amplification) and in resistance to treatment. Then we analyzed expression of EGFR ligands and founded an up-regulation of HBEGF in response to TMZ in two cell lines without expression of the repair enzyme MGMT the main resistance factor to TMZ. Counter-intuitively HBEGF is not involved in resistance but in TMZ-induced Mcl-1 degradation. This role is independent of EGFR activity. Implication of HBEGF in Mcl-1 degradation has no effect on caspases activity after TMZ treatment. Among the few known intracellular partners of HBEGF the chaperone protein BAG-1 is implicated in Mcl-1 expression maintenance. Indeed BAG-1 regulates Mcl-1 through its deubiquitinase USP9X. TMZ enable HBEGF/BAG-1 interactions and disable USP9X/Mcl-1 interactions.

Our results then identify Bak as the main apoptosis inducer in response to TMZ, propose a new mechanism for the induced degradation of Mcl-1 and highlight a new role of HBEGF independently of its receptor EGFR. Moreover they identify BAG-1 as a favored partner of HBEGF and implicate it in Mcl-1 regulation via its deubiquitinase USP9X.

**Keywords** : glioblastoma, temozolomide, apoptosis, Mcl-1, HBEGF

Quentin SERY

CRCNA INSERM U892 – CNRS 6299

8 quai Moncoussu - BP 70721

44007 NANTES cedex 1