

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Interconnexion(s) entre les mécanismes de mort cellulaire
et la différenciation ostéogénique dans les cellules souches
mésenchymateuses**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

présentée

et soutenue publiquement par

HUE Erika, Sonia, Anita

Le 23 octobre 2009, devant le jury ci-dessous

Président : M. GUICHEUX Jérôme, Directeur de Recherche, INSERM U791, Nantes
Rapporteurs : M. DOMENECH Jorge, PU, UPRES-RA3855, Tours
Mme TARTE Karin, PU/PH, INSERM U917, Rennes
Examineurs : M. HENDRICKS Denver, Senior Lecturer, University of Cape Town,
South Africa
Encadrante de thèse : Mme OLIVER Lisa, Ingénieur de Recherche CHU, Nantes
Directeur de thèse : M. VALLETTE François, Directeur de Recherche INSERM, Nantes

Interconnexion(s) entre les mécanismes de mort cellulaire et la différenciation ostéogénique dans les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont résistantes à l'apoptose après traitement avec différents inducteurs apoptotiques alors qu'elles expriment l'ensemble des protéines impliquées dans ce mécanisme (Oliver *et coll.*, soumis). Cependant, ces cellules acquièrent une sensibilité à l'apoptose après induction de leur différenciation. Nous étudions les mécanismes de différenciation des CSMs afin de comprendre comment ces cellules acquièrent une sensibilité à l'apoptose au cours de leur différenciation. Ceci nous permettra ensuite d'étudier le défaut responsable de l'échappement des cellules souches cancéreuses à l'apoptose.

L'étude protéique des CSMs non différenciées a montré la présence de la procaspase-3 (32 kDa) mais également une forme clivée de 29 kDa. De plus, un fragment de 25 kDa est également formé au cours de la différenciation ostéogénique. Ces formes de 29 et 25 kDa ont été précédemment décrites par notre équipe comme résultant d'un clivage de la procaspase-3 par la Calpaïne (Pelletier *et coll.*, 2005). En effet, l'inhibition de cette enzyme empêche le clivage de la Caspase-3 et retarde la différenciation. La Caspase3 semble donc jouer un rôle important dans la différenciation des CSMs. Cependant, l'extinction de la Caspase-3 (knock-down) retarde la différenciation mais sans pour autant l'inhiber totalement. Un mécanisme de compensation semble se mettre en place au cours de la différenciation en absence de la Caspase-3.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses (CSMs), Apoptose, Autophagie, Caspase-3, Différenciation

Interconnection(s) between programmed cell death (Type I) and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells.

The hMSCs are resistant to apoptosis after exposure to different apoptotic inducers, however, these cells do not lack any proteins implicated in apoptosis (Oliver *et al.*, submitted). Conversely, after an induction of differentiation, these cells acquire a sensitivity to apoptosis. Hence, by analysing the differentiation process of hMSCs, we could gain an insight into the acquisition of a sensibility to apoptosis in these cells. We hope to use this insight into the induction of apoptosis in cancer stem cells that appear to have the same resistance to apoptosis observed in normal stem cells

An analysis of the executioner caspase-3 in undifferentiated MSCs has revealed the presence of the proform (32 kDa) and a 29 kDa cleaved form of caspase-3 and during osteogenesis caspase-3 is cleaved into a 25 kDa form. These cleaved forms of caspase-3, 29 and 25 kDa were previously shown by our group to be the result of a cleavage by calpain (Pelletier *et al.*, 2005). Our data show that caspase-3 is important in the initial stages of osteogenic differentiation but not essential for osteogenic differentiation as a knock-down of caspase-3 delays but does not completely abrogate osteogenic differentiation. An activation of alternative pathways implicating an up-regulation of downstream or upstream partners may be involved.

Key words: Mesenchymal Stem Cells (MSCs), Apoptosis, Autophagy, Caspase-3, Differentiation

ABREVIATIONS

A

ACN: acetonitrile
ADAM10: A Disintegrin And Metallopeptidase 10
ADN/DNA: acide désoxyribonucléique / desoxyribonucleic acid
ADNc/cDNA: acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP: Adenosine DiPhosphate
AFBP/aP2: Adipocyte Fatty acid Binding Protein
AIF: Apoptosis Inducing Factor
ALLN: N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO
AMP: Adenosine monophosphate
AMPK: AMP kinase
Ang-1: angiopoïétine-1
APAF-1: Apoptotic Protease Activating Factor-1
APC: adenomatous polyposis coli
APC: Adenomatous Polyposis Coli
ARN/RNA: acide ribonucléique/ ribonucleic acid
ARNr: Acide ribonucléique ribosomique
ARNt: Acide ribonucléique de transfert
Asp: Asparagine
ATG: autophagy-related gene
ATM: ataxia-telangiectasia, mutated
ATP: Adenosine TriPhosphate
ATR: ATM and Rad3-related5azaC: 5-aza cytidine

B

Bad: Bcl-2 Antagonist of cell Death
Bak: Bcl-2 Antagonist Killer
Bax: Bcl-2 Associated X protein
BCIP/NBT: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium
Bcl-2: B-Cell Lymphoma protein 2
Bcl-B ou Bcl2L10: BCL-2 related X protein long isoform 10
Bcl-w ou Bcl2L2: BCL-2 related X protein long isoform 2
Bcl-X_L ou Bcl2L1: BCL-2 related X protein long isoform 1
Bcl-X_s: BCL-2 related X protein short isoform
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor
Bfl-1 ou Bcl2A1: Bcl-2 Antagonist 1
BH: Bcl-2 homology
Bid: BH3 Interacting Death agonist
Bik: Bcl-2-Interacting killer
Bim: Bcl-2-Interacting Mediator of cell death
BIR: baculovirus IAP repeat
BL21pLysE
BMP: Bone Morphologic Protein
BMPR: Bone Morphologic Protein Receptor
BNIP3: Bcl-2 nineteen-kilodalton interacting protein
BNIP3L Bcl-2 nineteen-kilodalton interacting protein long
BN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis
Bok/Mtd: Bcl-2-related Ovarian Killer/ Matador
BOP: BH3 Only protein
BRAC: BREast CANcer n°1
BrdU: Bromodeoxyuridine
BSA: Bovine Serum Albumin
BSP: Bone SialoProtein
BTF-3: Basic transcription factor 3

C

C/EBP: CAAT/Enhancer Binding Protein

c-Abl: Alberson
 CARD: Caspase Recruitment Domain
 CASBAH: CASpase Substrate dataBAse Homepage
 Cbfa1/Runx2: Core-Binding Factor 1/Runt-related transcription factor 2
 CD: Cluster of Differentiation
 CDC: Cell Divison Cycle
 CDK: cyclin dependant kinase
 CEB: cytochalsasin EDTE buffer
 c-FLIP: Cellular-FLICE inhibitory protein
 Chk1/2: Checkpoint 1/2
 CLAC: Cytochrome c Liberation Associated Conformation
 CollA1: Collagène 1A1
 CREB: cAMP Response Element Binding Protein
 CSCs: cellules souches cancéreuses
 CSHs: cellules souches hématopoïétiques
 CSMS/hCSMs: cellules souches mésenchymateuse (h pour humain)
 CXCL12 : chemokine (C-X-C motif) ligand 12
 CXCR4: chemokine (C-X-C motif) receptor 4
 Cy: cyanine
 Cys: Cystéine
D
 2D-DIGE: 2 dimensional difference gel electrophoresis
 DAPK: death-associated protein kinase
 DD: Death Domain
 DED: Death Effector Domain
 DISC: Death-Inducing Signal Complex
 Dkk: Dickkopf
 Dlx: Distal-less homeobox
 DMA: dimethyladipimide
 DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium
 DMS: dimethyl suberimide
 DMSO: dimethylsulfoxide
 DNA-PK: desoxyribonucleic acid-protein kinase
 DNase désoxyribonucléase
 DNMT: DNA (cytosine-C5) methyltransferase
 DO: densité optique
 DSB: DNA double strand breaks
 DSS: disuccinimidyl suberate
 DTT: DiThioThreitol
E
 ECL: enhanced chemoluminescence
 EF1A: Elongation factor 1 alpha
 EG: cellules Embryonic Germ
 EGF: epidermal growth factor
 EGFR: epidermal growth factor receptor
 EGS: ethylene glycolbis: succinimidylsuccinate
 EIF4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
 eIFs: eukaryotic initiation factors
 Epo: erythropoïétine
 ERK: Extracellular signal-regulated kinases
 ES: cellules Embryonic Stem
F
 F1ATPase: F1 portion of ATP synthase
 FACS: fluorescence activated cell sorter
 FADD: Fas-Associating protein with Death Domain
 FAK: focal adhesion kinase
 FGF: Fibroblast Growth Factor
 FITC: Fluoresceine Iso Thio Cyanate

FLICE: FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme
 Flt-3L: Fms-like tyrosine kinase Ligand
 FSC: Forward Scatter (taille des cellules)
 Fz: Frizzled
 G
 GAGs: glycosaminoglycanes sulfatés
 GFAP: Glial fibrillary acidic protein
 GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3b
 GTP: Guanosine-5'-triphosphate
 H
 HAT: Histone acetyltransférase
 HBS: HEPES buffered saline
 HBSS: hanks'balanced salt solution
 HDAC: histone déacétylase
 HEK293: human embryonic kidney293
 HIF-1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α
 HLA: Human Leukocyte Antigen
 hnRNP: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
 HRE: HIF response element
 HRP: horseradish peroxidase
 Hsf: heat shock factor-1
 HSP: Heat shock proteins
 hTERT: human telomerase reverse transcriptase
 HVSP: human Vacuolar Sorting Protein
 I
 IAP: Inhibitor of Apoptosis
 IBM: IAP Binding Motif
 ICE: Interleukin- β -Converting Enzyme
 IEF: Isoelectric Focusing
 IFN: Interferon
 IGF: Insulin Growth Factors
 IGFBP: IGF-Binding Protein
 IL: InterLeukine
 IPA: Ingenuity Pathways
 IPKB: Ingenuity Pathways Knowledge Base
 iPS: cellules souches pluripotentes induites
 J
 JAK: Janus protein tyrosine kinase
 JNK: c-Jun N-terminal Kinase
 JNK: c-jun N-terminal kinase
 L
 LASP1: LIM and SH3 protein 1
 LB: Luria Bertani
 LC3: Microtubule-Associated Protein Light Chain-3
 LEF: Lymphoid Enhancer Factor
 LIF: Leukemia Inhibitory Factor
 LIFR: Leukemia Inhibitory Factor Receptor
 LPL: Lipoprotein lipase
 LRP (Lipoprotein Receptor Protein)
 M
 3-MA: 3-méthyladénine
 MALDI TOF/TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-Of-Flight mass spectrometry
 MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
 Mcl-1: Myeloid Cell Leukaemia-1
 M-CSF: Macrophage-Colony Stimulating Factor
 MDC monodansyl cadaverine
 MDH: monodansylpentane
 MDM2: murine double minute 2

MEC: matrice extracellulaire
 MEM- α : Modified Eagle Medium-alpha
 MGP: Matrix gla protein
 MME: Membrane Mitochondriale Externe
 MOI: multiplicity of infection
 Mpl: Myeloproliferative leukemia virus oncogene
 MRN: Mre11/Rad50/Nbs1
 MS/MS: Mass spectrometry/ Mass spectrometry (spectrométrie de masse en tandem)
 MST1: Mammalian Steril Twenty-like kinase
 Msx: Msh homeobox
 mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
 MW: molecular mass
 N
 NAC: N-acetylcysteine
 NAIP: Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
 NF κ B: Nuclear Factor Kappa B
 NHEJ: Non-homologous end joining
 NIAP: Neuronal IAP
 NICD: Notch-1 intracellular domain
 NK: cellules Natural Killer
 NP40: Nonidet P-40
 NR4A1: Nuclear Receptor 4A1
 NuMa: nuclear matrix
 O
 OCN: ostéocalcine
 OGM: osteoblast growth medium
 ON: ostéonectine
 OPN: ospéopontine
 OSAD: ostéoadhérine
 Osx: Osterix
 P
 pO₂: pression en oxygène
 PABP4: poly(A) binding protein 4
 PAL: Phosphatase Alcaline
 PAL: phosphatase alcaline
 PARP: poly-ADP-ribose-polymérase
 PBS: phosphate buffered saline
 PCNA: proliferating cell nuclear antigen
 PCR: polymerase chain reaction
 PDGF: Platelet-derived Growth Factor
 PDIA3: protein disulfide isomerase family A, member 3
 PE: Phosphatidyl Ethanolamine:
 PE: phosphatidyléthanolamine
 Pi: phosphate inorganique
 PI: phosphoinositides
 pI: point isoelectrique
 PI3K de classe III: phosphatidylinositol-3 kinase de classe III
 PI-3-P: phosphoinositide-3-phosphate
 Pit: Phosphate inorganic transporter
 PKC: protéine kinase C
 PMSF: phenylmethanesulphonylfluoride or phenylmethylsulphonyl fluoride
 PPAR: peroxisome proliferator activated receptor
 PSMF1: Proteasome inhibitor subunit 1 ou PI31
 PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
 Puma/BBC3: Bcl-2 Binding Component 3
 PVDF: polyvinylidene difluoride
 Q
 qPCR: quantitative polymerase chain reaction

R

Rb: RetinoBlastome
RE: Réticulum Endoplasmique
REDD1/2: REgulated in Development and DNA damage responses ½
RET: REarranged during Transfection
Rheb: Ras homolog enriched in brain
RIP: Receptor-Interacting Protein
RNase: ribonucléase
ROS: espèces actives de l'oxygène
Rpm: rotation par minute
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
RXR: Retinoid X Receptor

S

SCF: Skp1-Cullin-F-box protein
SDF-1 α : Stromal cell-derived Factor 1 alpha
SDS: sodium dodecyl sulphate
SH2: Src homology 2
Shh: sonic Hedgehog
shRNA: short harpin RNA
SIDA: Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SLF: Steel Factor
Smac: Second Mitochondrial Activator of Caspases
SNC: système nerveux central
SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Proteins
SRP72: signal recognition particle 72
SRPKs: stress-responsive protein kinases
SSC: Side Scatter (granulométrie des cellules)
STAT: Signal Transducers and activators of transcription
STS: Staurosporine
SVF: sérum de veau fœtal
SOD2: superoxide dismutase 2

T

TAE: Tris-Acetate EDTA
TCA (acide trichloroacétique)
TCR: T cell receptor
TEMED: Tetramethylethylenediamine
TG: triglycérides
TGF: Transforming Growth Factor
TLDA TaqmanLow Density Array
TM: transmembranaire
TNF: Tumor Necrosis Factor
TOM22: Translocase of the Outer Mitochondrial membrane of 22 kDa
TPO: thrombopoïétine
TRADD: TRAIL ReceptorAssociating protein with Death Domain
TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TSA: trichostatine A
TSC1/2: Tuberous Sclerosis Complex
TSS: Transformation and Storage of bacterial cells in the Same solution

U

UV: ultraviolet
UVRAG: UV irradiation Resistance Associated Gene

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VLA-4: Very Late Antigen-4

W

Wnt: wingless

X

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein
Y
YCA1: Yeast Caspase 1

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
A. LES CELLULES SOUCHES	2
1. GENERALITES SUR LES CELLULES SOUCHES	2
1.1. Définition des cellules souches.....	2
1.1.1. Les cellules souches totipotentes.....	3
1.1.2. Les cellules souches pluripotentes.....	3
1.1.2.1. Les cellules souches embryonnaires.....	3
1.1.2.2. Les cellules souches fœtales.....	4
1.1.3. Les cellules souches multipotentes.....	4
1.1.4. Les cellules souches unipotentes.....	6
1.1.5. Les cellules souches pluripotentes induites.....	6
2. LES NICHES DE CELLULES SOUCHES	7
2.1. Structure de la niche médullaire.....	8
2.2. La pression en oxygène.....	10
2.3. Rôles des niches.....	11
2.3.1. Autorenewement et pluripotence des cellules souches.....	11
2.3.1.1. L'autorenewement.....	11
2.3.1.2. La pluripotence des cellules souches.....	12
2.3.1.3. La voie LIF/ gp130/ STAT3.....	12
2.3.1.4. La voie BMP/Smad.....	14
2.3.1.5. La voie Wnt/ β caténine/ TCF.....	14
2.3.1.6. Les facteurs de transcription : Oct4, Sox2 et Nanog.....	16
2.3.1.7. La voie Notch.....	17
2.3.2. Quiescence / Sénescence.....	19
3. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES	20
3.1. Identification des cellules souches mésenchymateuses.....	20
3.2. Différenciation des CSMs.....	21
3.2.1. Différenciation ostéoblastique <i>in vivo</i>	21
3.2.1.1. L'engagement et la prolifération.....	22
3.2.1.2. La différenciation ostéogénique.....	23
3.2.1.3. Formation de la matrice extracellulaire osseuse.....	24
3.2.2. Différenciation chondrogénique <i>in vivo</i>	25
3.2.3. Différenciation adipocytaire <i>in vivo</i>	27
3.3. Les propriétés biologiques des CSMs.....	28
3.3.1. Soutien de l'hématopoïèse.....	28
3.3.2. Les CSMs et l'immunomodulation de la réponse lymphocytaire T.....	29
3.3.3. Les CSMs et leurs implications tumorales.....	29
B. LES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE	30
1. VUE GENERALE SUR LES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE	30
2. L'APOPTOSE OU MORT CELLULAIRE DE TYPE I	32
2.1. Définition de l'apoptose.....	32
2.2. Physiologie de la mort cellulaire.....	33
2.3. Les protéines de la famille de Bcl-2.....	34

2.3.1.	Présentation des membres de la famille de Bcl-2.....	34
2.3.1.1.	Les protéines anti-apoptotiques.....	34
2.3.1.2.	Les protéines pro-apoptotiques à multidomains.....	35
2.3.1.3.	Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-seul.....	35
2.3.2.	Structure primaire des membres de la famille de Bcl-2.....	37
2.3.2.1.	Le domaine BH3.....	37
2.3.2.2.	Les domaines BH1 et BH2.....	38
2.3.2.3.	Le domaine BH4.....	38
2.3.2.4.	Le domaine transmembranaire C-terminal.....	38
2.3.3.	Bcl-2 et Bcl-xL : protéines pro-apoptotiques?.....	38
2.3.3.1.	Clivage de Bcl-2.....	38
2.3.3.2.	Phosphorylation de Bcl-2.....	39
2.3.3.3.	Interactions Bcl-2/Nur77.....	39
2.4.	Les Caspases.....	41
2.4.1.	Nomenclature.....	41
2.4.2.	Structure.....	42
2.4.3.	Activation des Caspases.....	43
2.4.4.	Substrats des Caspases.....	46
2.4.5.	Régulation des Caspases.....	48
2.4.5.1.	Les IAPs ou Inhibitors of Apoptosis Protein.....	48
2.4.5.2.	Les protéines FLIP.....	50
2.5.	Les mécanismes de l'apoptose.....	50
2.5.1.	Voie extrinsèque ou voie des récepteurs à domaine de mort.....	51
2.5.2.	Voie intrinsèque, voie mitochondriale ou de la famille de Bcl-2.....	52
2.5.2.1.	Adressage de Bax à la mitochondrie et perméabilisation de la mitochondrie.....	53
2.5.2.2.	Libération du cytochrome c et formation de l'apoptosome.....	54
2.5.2.3.	Rôles des protéines Smac/Diablo et Omi/Htra2.....	55
2.5.2.4.	Rôles des protéines AIF et EndoG.....	57
2.5.3.	Voie intrinsèque passant par le Réticulum Endoplasmique.....	57
2.5.4.	L'apoptose indépendante des Caspases.....	58
3.	AUTOPHAGIE OU MORT CELLULAIRE DE TYPE II	59
3.1.	Macroautophagie.....	59
3.1.1.	Processus.....	59
3.1.2.	Rôles physiologiques.....	60
3.1.2.1.	Maintien de l'homéostasie.....	60
3.1.2.2.	Développement.....	60
3.2.	Les protéines de la famille des Atg.....	62
3.3.	Régulation de l'autophagie.....	62
3.4.	La formation de l'autophagosome.....	65
3.4.1.	Initiation de l'autophagie.....	65
3.4.2.	Le rôle pro-autophagique du complexe PI3K-Beclin 1.....	66
3.4.3.	Les systèmes de conjugaison et leur implication dans la formation des autophagosomes.....	67
3.5.	Autophagie ou mort cellulaire programmée de type II.....	68
4.	INTERCONNEXIONS ENTRE L'AUTOPHAGIE ET L'APOPTOSE	
	68	
4.1.	Interconnexions conceptuelles.....	68

4.2.	Interconnexions moléculaires	69
4.2.1.	Bcl-2 et Bcl-xL	69
4.2.2.	BNIP3.....	72
4.2.3.	Atg5.....	73
5.	ROLES NON-APOPTOTIQUES DES CASPASES	74
5.1.	Le processus inflammatoire.....	75
5.2.	La prolifération et le cycle cellulaire.....	76
5.3.	La migration cellulaire.....	77
5.4.	La réparation des dommages à l'ADN.....	78
5.5.	La différenciation.....	78
5.5.1.	Différenciation avec énucléation	78
5.5.1.1.	Maturation érythropoïétique.....	79
5.5.1.2.	Différenciation terminale des fibres cristallines	80
5.5.1.3.	Différenciation terminale des kératinocytes	81
5.5.2.	Différenciation sans énucléation.....	81
5.5.2.1.	Formation des muscles squelettiques.....	81
5.5.2.2.	La mégacaryocytopoïèse et la formation des plaquettes	82
5.5.2.3.	Différenciation des monocytes en macrophages	83
5.5.2.4.	Différenciation neurale	83
5.5.2.5.	Différenciation des spermatozoïdes.....	84
5.5.2.6.	Différenciation des cellules ostéoblastiques.....	84
PROJET	85
MATERIELS ET METHODES	89
METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE	89
1. CULTURE CELLULAIRE	89
1.1.	Cellules souches mésenchymateuses ou CSMs	89
1.1.1.	Différenciation ostéogénique.....	90
1.1.2.	Différenciation adipocytaire	90
1.1.3.	Différenciation chondrogénique.....	90
1.2.	Ostéoblastes humains.....	91
1.3.	Test de viabilité cellulaire ou Test d'exclusion au Bleu trypan	91
2. TRANSFECTION ET INFECTION DES CELLULES	91
2.1.	Nucléofection.....	92
2.2.	Infection virale.....	92
3. ANALYSES DE BIOLOGIE CELLULAIRE	93
3.1.	coloration rouge alizarine	93
3.2.	Coloration des chondrocytes.....	93
4. MICROINJECTION	94
5. ANALYSE PROTEIQUE PAR FACS (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER)	94
5.1.	Analyse du phénotype des hCSMs.....	94
5.2.	Analyse de l'apoptose par marquage à l'Apo2. 7	95
5.3.	Marquage de la Caspase-3 active	95
METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	96
1. CULTURE BACTERIENNE	96
1.1.	Milieux et conditions de culture bactérienne.....	96

1.2.	Transformation de cellules bactériennes	96
2.	CONSTRUCTION DES PLASMIDES	97
2.1.	Extraction de l'ADN plasmidique.....	97
2.2.	Amplification des fragments par PCR.....	97
2.3.	Digestions enzymatiques	97
2.4.	Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose et purification	98
2.5.	Ligation.....	98
3.	ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ARN	98
3.1.	Extraction d'ARN totaux.....	98
3.2.	PCR (Polymerase Chain reaction) quantitative en temps réel	99
3.2.1.	Transcription Inverse	99
3.2.2.	PCR quantitative en temps réel	99
3.3.	TaqMan® Low Density Array (TLDA).....	100
METHODES DE BIOCHIMIE.....		100
1.	SYNTHESE, PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES	100
1.1.	Synthèse in vitro de protéines.....	100
1.2.	Production de protéines recombinantes	101
1.2.1.	Extraction de protéines recombinantes	101
1.2.2.	Purification des protéines His-tag.....	101
2.	ANALYSES PROTEIQUES	102
2.1.	Extraction des protéines totales	102
2.2.	Extraction des protéines nucléaires.....	102
2.3.	Fractionnement subcellulaire	103
2.4.	Association des protéines synthétisées dans un système acellulaire	103
2.5.	Pontage moléculaire ou Crosslinking	103
2.6.	Gels Bidimensionnels (2D)	104
2.6.1.	Préparation des échantillons.....	104
2.6.2.	BN-PAGE (1 ^{ère} dimension)	104
2.6.3.	SDS-PAGE (2 ^{ème} dimension).....	105
2.7.	Electrophorèse.....	105
2.8.	Immunoempreinte	106
2.9.	Immunodétection ou Western-Blotting	106
3.	IMMUNOCYTOCHIMIE	108
3.1.	Marquage immunocytochimique.....	108
3.2.	Activité Calpaïne in vivo.....	109
3.3.	Analyse des marquages γ -H2AX avec BlobFinder	109
4.	ACTIVITES ENZYMATIQUES	109
4.1.	Dosage de l'activité Caspase	109
4.2.	Dosage de l'activité Calpaïne.....	110
4.3.	Dosage de l'activité du protéasome	110
4.4.	Dosage de l'activité de la Phosphatase Alcaline	110
5.	MESURE DE LA CAPACITE AUTOPHAGIQUE	112
5.1.	Induction de l'autophagie	112
5.2.	Marquage des vacuoles autophagiques par le MDH.....	112

5.3. Mesure de la dégradation des protéines à longue durée de vie par protéolyse.....	112
5.4. Visualisation des vacuoles autophagiques par microscopie électronique à transmission.....	113
6. 2D-DIGE ET MALDI TOF TOF	114
6.1. Préparation des échantillons.....	114
6.2. L'électrophorèse bi-dimensionnelle.....	116
6.3. Analyse de l'électrophorèse bi-dimensionnelle.....	117
6.4. Piquage des spots d'intérêt.....	117
6.5. Protéolyse et extraction des peptides.....	118
6.6. Chargement des ZipTip et analyse au MALDI-TOF-TOF.....	119
6.7. Identification et recherche dans les bases de données.....	119
6.8. Analyse des voies protéiques.....	119
RESULTATS	121
CHAPITRE I: ETUDES DES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES	121
AVANT-PROPOS.....	121
ARTICLE: DECREASED AUTOPHAGY AND ENHANCED APOPTOSIS ACCOMPAGNY THE IN VITRO EARLY DIFFERENTIATION OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS.....	122
1. Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses.....	122
2. Etude de la sensibilité à l'apoptose des hCSMs non différenciées.....	124
3. Etude de la sensibilité à l'apoptose des hCSMs différenciées.....	127
4. Réparations des dommages à l'ADN.....	131
5. Etude de l'activité autophagique des hCSMs non différenciées et différenciées.....	133
6. Importance de Bcl-xL dans la survie des hCSMs.....	136
7. Régulation épigénétique de Bcl-2 dans les hCSMs.....	138
CHAPITRE II : ROLE DE LA CASPASE-3 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION	142
AVANT-PROPOS.....	142
ARTICLE : PUTATIVE ROLE OF CASPASE-3 DURING MESENCHYMAL STEM CELLS DIFFERENTIATION (EN REDACTION).....	143
1. Implication de la calpaïne dans la différenciation ostéogénique.....	144
2. Importance de la Caspase-3 dans la différenciation ostéogénique.....	147
3. Implication de Notch-1 dans la différenciation ostéogénique.....	155
CHAPITRE III : SUBSTRATS DE LA CASPASE-3 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION OSTEOGENIQUE	159
1. Identification des substrats de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation ostéogénique.....	162
2. Réalisation de réseaux protéiques potentiellement activés au cours de la différenciation ostéogénique et en présence de la Caspase-3 p25.....	166
DISCUSSION CONCLUSION	169

A. Etudes des mécanismes de mort cellulaire dans les cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs)	170
B. Rôle de la Caspase-3 au cours de la différenciation	173
1. Importance de la Caspase-3 au cours de la différenciation	173
2. Rôle de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation ostéogénique	177
3. Substrats possibles de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	182
ANNEXES	207
ANNEXE 1 : Article “Decreased autophagy and enhanced apoptosis accompany the in vitro early differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells”	208
ANNEXE 2 : Index des protéines présentes dans les réseaux	234
ANNEXE 3 : Article de Master 2 Recherche.....	237

INTRODUCTION

N

A. LES CELLULES SOUCHES

1. GENERALITES SUR LES CELLULES SOUCHES

1.1. Définition des cellules souches

Le terme de "cellule souche" est utilisé pour désigner une cellule capable d'autorenouvellement, ou encore de se multiplier à l'identique quasi infiniment. Cette cellule n'exprime aucune spécialisation, elle est dite indifférenciée. Cependant, la cellule souche est capable de produire des cellules spécialisées avec un processus dit de différenciation. Au cours de ce processus, elles acquièrent une morphologie et une fonction spécifique d'un tissu donné. Il existe plusieurs types de cellules souches selon leur capacité de différenciation : les cellules souches *totipotentes*, pluripotentes, multipotentes et unipotentes ou précurseurs (Figure 1).

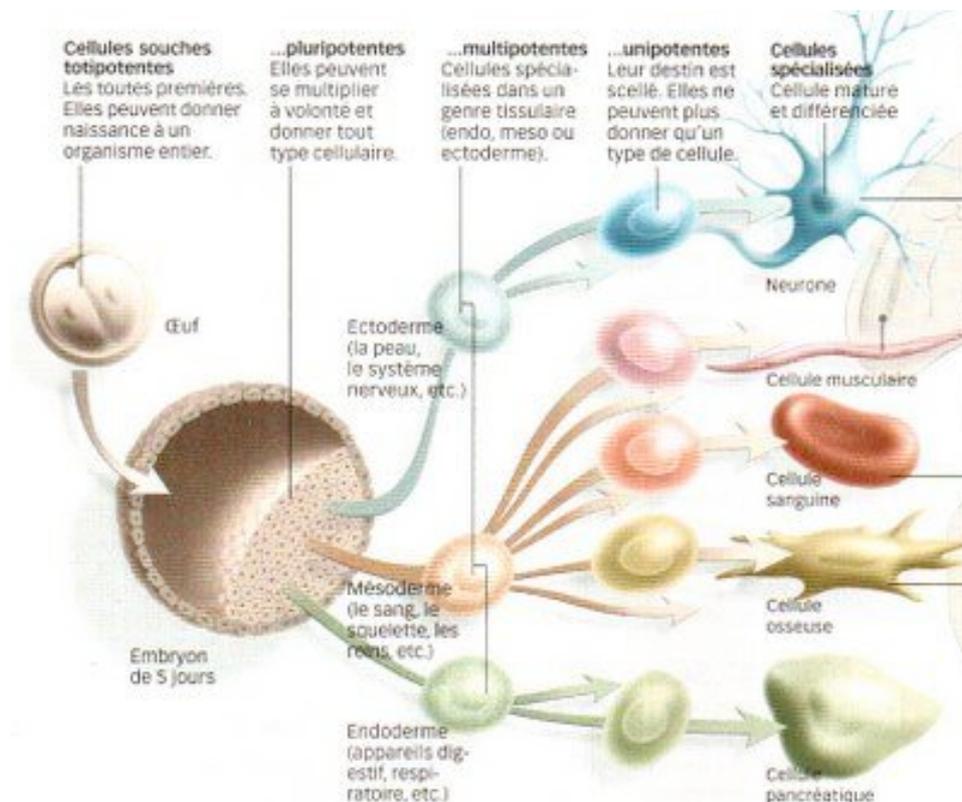


Figure 1 : Apparition des cellules souches au cours du développement embryonnaire humain et descendance des cellules souches de chaque feuillet embryonnaire. (www.vivelessvt.com)

Un dogme sur les cellules souches est rapidement énoncé : " Une cellule souche nichée dans un tissu donné n'engendre que les seules cellules spécialisées de ce tissu. Cette cellule ne peut pas adopter dans sa descendance le destin de deux feuilletts embryonnaires différents" (Figure 1). Cependant ce dogme est transgressé dès 1999. En effet, Bjornson injecte des neurosphères par intraveineuse dans une souris irradiée (Bjornson *et coll.*, 1999). Les neurosphères sont des agrégats cellulaires sphériques issus de la prolifération *in vitro* de progéniteurs immatures provenant du striatum (cerveau) de souris adulte. Or, ces neurosphères produisent des cellules sanguines fonctionnelles dans les souris irradiées (Bjornson *et coll.*, 1999). Après cet article, d'autres descriptions inattendues ont été décrites concernant les cellules de la moelle osseuse. En effet la moelle peut donner du foie/cellules épithéliales (Petersen *et coll.*, 1999 ; LaBarge et Blau, 2002), du muscle/myocytes (Theise *et coll.*, 2000), de l'épithélium (Hristov *et coll.*, 2003 ; Bailey *et coll.*, 2004) et du rein/cellules rénales (Lin et Igarashi, 2003). De plus, il a également été décrit que les cellules musculaires peuvent donner des cellules sanguines (Jackson *et coll.*, 1999, Seale *et coll.*, 2000) et les cellules sanguines peuvent donner du cerveau/neurones (Brazelton *et coll.*, 2000 ; Mezey *et coll.*, 2000). La descendance d'une cellule souche peut donc être engagée dans des voies de différenciation provenant de deux feuilletts embryonnaires différents.

1.1.1. Les cellules souches totipotentes

Etymologiquement, la totipotence signifie "tout pouvoir" indiquant que ces cellules peuvent être différenciées théoriquement en tout type cellulaire de l'organisme. En effet, les cellules souches totipotentes sont les seules à permettre le développement d'un individu à condition d'être situées *in utero*. En effet, l'orientation de l'embryon est nécessaire à son développement mais elle est impossible *in vitro*. Les cellules souches totipotentes correspondent à l'ovocyte fécondé et aux cellules issues des premières divisions de cet œuf jusqu'au stade morula de 2 à 8 cellules (4^{ème} jour de développement).

1.1.2. Les cellules souches pluripotentes

1.1.2.1. Les cellules souches embryonnaires

Au stade de blastocyste (5^{ème} jour de développement), chacune des cellules de la masse interne du blastocyste est pluripotente, voire totipotente. Ce sont les cellules souches embryonnaires ou cellules ES (Embryonic Stem). Ces cellules peuvent produire tous les

feuillet embryonnaire (ectoderme, mésoderme, endoderme) ainsi que les tissus qui en dérivent (Thomson *et coll.*, 1998). S'il est implanté dans l'utérus, le blastocyste entier peut se développer en un fœtus viable.

Une fois le blastocyste dissocié, les cellules ES qui en sont extraites ont perdu toute possibilité de se développer ultérieurement en embryon. Cependant, ces cellules ES peuvent être cultivées à l'infini en laboratoire tout en conservant leur caractère de pluripotence et leur génome intact (Evans et Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Il est donc possible d'obtenir des millions de cellules ES pluripotentes à partir d'un petit nombre de cellules embryonnaires de blastocyste. Placées dans des conditions de culture précises, ces cellules possèdent la capacité de se différencier en des cellules spécialisées correspondant à tous les tissus de l'organisme (cœur, sang, neurones, ...). Les cellules ES peuvent également reformer un embryon mais à la stricte condition qu'elles soient réintroduites dans un blastocyste appelé hôte.

1.1.2.2. Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont issues de tissus à un stade beaucoup plus tardif du développement embryonnaire (5-9 semaines) que le stade de blastocyste embryonnaire. Elles sont isolées à partir de fœtus résultant d'une interruption volontaire de grossesse. Nous distinguons deux classes cellulaires : les cellules souches fœtales dites somatiques (Evans et Kaufman, 1981 ; Martin, 1981) et les cellules germinales dites cellules EG (Embryonic Germ cell) (Bradley *et coll.*, 1984 ; Resnick *et coll.*, 1992). Ces dernières sont issues de l'ébauche du tissu germinale du fœtus. Elles ont donc la particularité d'être déjà orientées vers un type cellulaire particulier. Cependant, elles restent pluripotentes comme les cellules ES et ont la même capacité de prolifération que ces dernières (Turnpenny *et coll.*, 2003). Leur génome est toutefois moins stable que celui des cellules ES, ce qui les rend, pour l'instant, inutilisables dans une perspective thérapeutique, alors qu'elles ouvrent d'importantes perspectives en recherche fondamentale.

1.1.3. Les cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes sont présentes dans l'embryon mais également dans l'organisme adulte, également nommées cellules souches adultes. Elles possèdent la capacité de s'autorenouveler. Cependant, ces cellules sont déjà engagées dans une certaine direction

donc leur potentialité de différenciation est plus restreinte que celles des cellules ES [pour revue, Wagers et Weissman, 2004].

Dans des conditions de culture appropriées, ces cellules peuvent se répliquer indéfiniment en conservant leur caractère indifférencié et leur multipotence. Elles peuvent également se différencier en plus de 15 types de tissus, en présence de combinaisons précises de facteurs de différenciation (Pittenger *et coll.*, 1999).

Les cellules souches adultes sont des cellules indifférenciées présentes au sein des tissus. Ce sont principalement des cellules multipotentes pouvant s'engager dans différentes lignées cellulaires au sein d'un tissu. D'autres cellules souches adultes ne sont qu'unipotentes comme les cellules souches épithéliales. Cependant, l'ensemble des cellules souches adultes assurent l'homéostasie des organes et des tissus. Elles remplacent les cellules mortes naturellement ou suite à une lésion. Elles assurent ainsi la fonctionnalité de l'organe tout de long de la vie de l'individu. Plusieurs types de cellules souches répondant à cette définition ont été identifiés avec certitude chez l'homme :

- Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) sont présentes dans la moelle osseuse (Robin *et coll.*, 1999). Elles produisent toutes les cellules sanguines : érythrocytes, mégacaryocytes et lymphocytes ainsi que certaines structures vasculaires.
- Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont présentes dans la moelle osseuse (Bianco et Gehron Robey, 2000) . Elles sont capables de s'engager dans de nombreuses voies de différenciation telles que l'ostéogenèse, la chondrogenèse et l'adipogenèse (développé dans le chapitre A.3.2 de l'introduction).
- Les cellules souches du tissu adipeux possèdent les mêmes capacités de différenciation que les cellules souches mésenchymateuses mais avec une prédisposition pour la différenciation adipogénique (Gronthos *et coll.*, 2001).
- Les cellules souches nerveuses sont présentes dans les zones subventriculaires et ventriculaires au niveau du système nerveux central ainsi qu'au niveau de l'hippocampe (Gage, 2000). Elles se différencient en neurones, mais aussi en cellules du système nerveux comme les astrocytes et les oligodendrocytes.
- Les cellules souches musculaires sont présentes dans le muscle squelettique (Renault *et coll.*, 2000).

- Les cellules souches épidermiques sont présentes au niveau des follicules pileux (Rochat *et coll.*, 1994). Elles sont unipotentes et ne se différencient qu'en kératinocytes.
- Les cellules souches intestinales sont présentes dans les cryptes intestinales (Booth et Potten, 2000).
- Les cellules souches hépatobiliaires

Nous nous concentrerons sur les cellules souches mésenchymateuses ou CSMs tout au long de ce mémoire et nous ne développerons que les niches médullaires.

1.1.4. Les cellules souches unipotentes

Tout en gardant leur capacité d'autorenouvellement, les cellules souches unipotentes ne peuvent produire qu'un seul type cellulaire comme la peau, le foie ou la muqueuse intestinale. Elles sont également appelées précurseurs.

Cependant, certains organes comme le cœur et le pancréas ne renferment pas de cellules souches et n'ont donc aucune possibilité de régénération en cas de lésion.

1.1.5. Les cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS cells pour inductive pluripotent stem cells) ont été découvertes il y a 3 ans. Elles représentent une avancée majeure dans la recherche des cellules souches [pour revue, Amabile et Meissner, 2009]. Les iPS sont des cellules somatiques adultes différenciées reprogrammées en cellules pluripotentes. Les premières iPS ont été produites à partir de fibroblastes murins dès 2006 (Takahashi et Yamanaka, 2006 ; Yamanaka, 2007 ; Okita *et coll.*, 2007). Pour cela, certains gènes responsables de la pluripotence des cellules ES ont été introduits dans leur noyau par transfection au moyen de vecteurs rétroviraux. Il s'agit des gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc, normalement exprimés pendant le développement embryonnaire. Dès 2007, des iPS ont été produites à partir de fibroblastes humains en y introduisant les gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et Lin28 (Takahashi *et coll.*, 2007 ; Yu *et coll.*, 2007). Après quelques semaines en culture, certaines cellules expriment la protéine Nanog, marqueur de la pluripotence cellulaire. Elles sont donc considérées comme pluripotentes.

Cette technique permet d'obtenir des cellules souches pluripotentes sans avoir recours à des embryons. L'utilisation thérapeutique potentielle de ces cellules pluripotentes ne pose pas le problème éthique de l'embryon. Cependant, le transfert aléatoire des gènes viraux dans leur

génomique est l'une des limites de leur utilisation. En effet, l'insertion de ces gènes peut induire des mutations voire immortaliser ces cellules (Yu *et coll.*, 2007).

2. LES NICHE DE CELLULES SOUCHES

Les cellules souches sont responsables de la croissance, de l'homéostasie et de la réparation de nombreux tissus. Pour la première fois en 1978, la notion de niche cellulaire est proposée par Schofield. Il suggère que les cellules souches résident dans des compartiments fixes, lesquels sont favorables à la maintenance des propriétés définitives des cellules souches (Schofield, 1978). Ces niches sont composées non seulement des cellules souches elles-mêmes, mais également d'autres types cellulaires de soutien. Ces dernières génèrent un environnement riche en facteurs et molécules servant à maintenir l'état indifférencié des cellules souches. Ce compartiment anatomique fixe protège les cellules souches des attaques extérieures et permet ainsi leur survie. Les signaux émanant des niches régulent l'autorenouvellement, la survie et la maintenance des cellules souches (Kimble et White, 1981 ; Henderson *et coll.*, 1994 ; Xie et Spradling, 2000 ; Tulina et Matunis, 2001).

Les cellules souches des différents tissus sont régulées spécifiquement en réponse aux demandes de remplacement/renouvellement cellulaire. Les niches possèdent la capacité de fournir les signaux homéostatiques et de développement, appropriés à chaque tissu. Par exemple, dans certains systèmes, comme le sang, l'intestin et la peau, les cellules souches sont constamment actives afin de reconstituer des cellules adultes ayant une durée de vie limitée. Dans ces conditions, la niche doit fournir les signaux appropriés pour équilibrer la balance entre l'autorenouvellement et la différenciation de ces cellules souches. En effet, elle doit maintenir la production de cellules spécialisées sans pour autant épuiser la réserve de cellules souches.

A l'inverse, dans d'autres tissus comme le muscle squelettique, les progéniteurs adultes des cellules (comme les fibres musculaires) possèdent une grande longévité. Leur remplacement est typiquement dû à une blessure ou à une pathologie. Dans ce cas, la niche doit permettre l'autorenouvellement et la survie des cellules souches. Elle doit également fournir des signaux inhibant leur différenciation en conditions normales. Cependant, la niche doit aussi maintenir

la sensibilité des cellules souches aux signaux régénératoires afin qu'elles puissent être mobilisées si nécessaire.

Finalement, dans certains systèmes, comme le sang, les deux fonctions sont nécessaires. En effet, les CSHs ne doivent pas seulement maintenir la production quotidienne de cellules sanguines. Elles doivent également répondre rapidement et fortement en augmentant le nombre de précurseurs cellulaires à toute attaque du système hématopoïétique (Morrison *et coll.*, 1997).

La dérégulation de ces niches peut être la cause de nombreuses pathologies associées à une dégénération tissulaire, le vieillissement et la tumorigenèse.

2.1. Structure de la niche médullaire

Il existe de nombreuses descriptions de systèmes de niches et leur synthèse a permis de définir un prototype de niche cellulaire (Figure 2). Chaque niche est composée de cellules souches et de cellules stromales de soutien qui interagissent directement. Cet ancrage au sein de microenvironnements protecteurs se fait par liaison des cellules souches à la lame basale. Celle-ci est constituée de laminine, de collagène et de protéoglycanes. L'ancrage à la matrice extracellulaire est vital au maintien de l'identité des cellules souches dans de nombreux systèmes (Fuchs *et coll.*, 2004). Une forte expression des récepteurs de la lame basale, comme l'intégrine- β 1, est caractéristique de la présence de CSHs dans la moelle osseuse (Wagers *et coll.*, 2002).

Les cellules de soutien tapissant les niches expriment également des protéines d'adhésion, protéines transmembranaires appelées cadhérines. Par exemple, les ostéoblastes expriment la N-cadhérine, ce qui leur permet de maintenir les CSHs et les CSMs au sein des niches médullaires (Zhang *et coll.*, 2003). Les relations entre ces cellules polarisent les cellules souches dans les niches, ce qui provoque alors une division asymétrique de ces cellules (Deng et Lin, 1997 ; Yamashita *et coll.*, 2003). De plus, l'adhésion entre les cellules souches et les cellules stromales avec la matrice extracellulaire permet une proximité des signaux de survie et facilite ainsi l'autorenouvellement (Song et Xie, 2002 ; Song *et coll.*, 2002).

L'autorenouvellement des cellules souches est défini par la capacité des cellules à se multiplier tout en gardant leur potentiel de prolifération et de différenciation. *In vivo*, la plupart des cellules souches sont quiescentes (sauf les CSHs, les cellules souches épithéliales

et intestinales) dans leur microenvironnement et le nombre de cellules souches reste constant. Cependant il peut augmenter en cas de dommages ou de blessures (Caplan, 2007).

De nombreuses voies de signalisation ont été décrites comme impliquées dans le maintien de l'homéostasie des niches (Wnt, Notch, BMPs, FGFs, LIF, ...). Cependant, les conséquences de leur activation sont encore mal cernées et diffèrent d'un système à l'autre [pour revue, Walker *et coll.*, 2009].

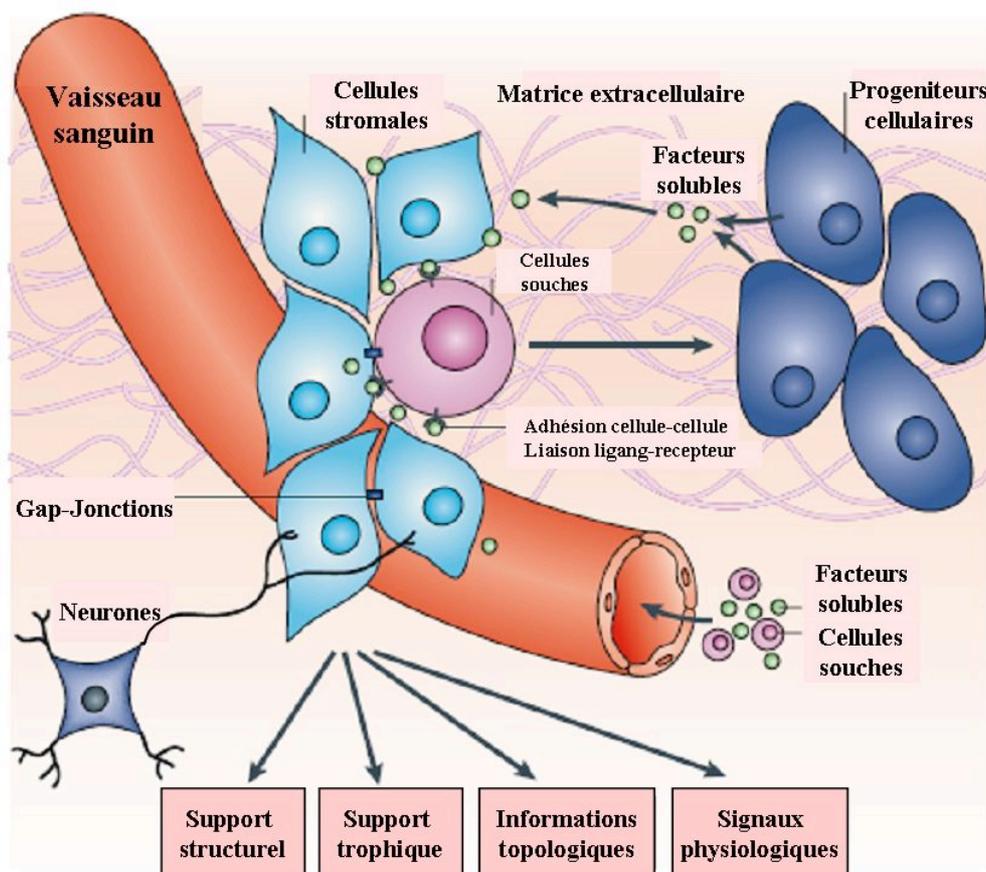


Figure 2 : Composition et fonctions des niches de cellules souches (D'après Jones et Wagers, 2008).

En plus des facteurs protéiques sécrétés, de petites molécules, ainsi que certains ions représentent d'importants signaux dans les niches de cellules souches. Par exemple, dans la moelle osseuse, la présence d'une forte concentration en Ca^{2+} facilite la localisation des CSHs adjacentes des ostéoblastes à l'endosteum (Adams *et coll.*, 2006).

Les vaisseaux sanguins permettent également l'apport de signaux systémiques et le recrutement des cellules inflammatoires ainsi que d'autres cellules circulantes vers les niches. Le système sanguin exprime aussi certains récepteurs d'adhésion, comme le SCF/c-kit (Gu *et*

coll., 2003) et le CXCL12/CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) (Sugiyama *et coll.*, 2006) retenant également les CSHs dans les niches. L'activation de la signalisation de SCF *via* son récepteur c-kit permet de réguler la prolifération et la survie des CSHs. Cette voie de signalisation contrôle également l'activation des CSHs et leur libération de la niche médullaire (Heissig *et coll.*, 2002). De la même façon, des neurones peuvent communiquer des signaux physiologiques lointains au microenvironnement protecteur des cellules souches. Les niches de cellules souches apportent un support structurel, trophique, des informations topologiques et des signaux physiologiques appropriés pour réguler les fonctions des cellules souches dans l'organisme (figure 2). Bien que toutes les niches ne possèdent pas nécessairement l'ensemble de ces composantes, il est clair que la niche est une entité complexe et dynamique. La communication au sein de la niche est essentielle au maintien des fonctions propres des cellules souches. En effet, elle permet l'intégration de nombreux signaux afin de contrôler le nombre, la fonction et de maintenir l'état indifférencié des cellules souches (Lin, 2002 ; Li et Xie, 2005). Les niches médullaires protègent les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses des contraintes extérieures.

2.2. La pression en oxygène

L'oxygène, également appelé dioxygène, est un gaz diatomique essentiel au cycle de la vie. En effet, les animaux et les végétaux en consomment au cours de leur respiration. De plus, l'oxygène est un composant essentiel des molécules qui se retrouvent dans tout être vivant, comme les acides aminés, les sucres et bien d'autres.

La pression atmosphérique atteint 21% en oxygène. Cependant, la concentration en oxygène n'est plus que de 14% dans les alvéoles pulmonaires et elle est comprise entre 5% et 10% dans le cerveau en conditions normales (Dings *et coll.*, 1998 ; Evans *et coll.*, 2004). Les niches médullaires de cellules souches sont également situées dans des régions hypoxiques. En effet, la pression en oxygène (pO_2) est de 0, 7 à 10% dans la moelle osseuse (Brighton et Krebs, 1972 ; Potier *et coll.*, 2007). La pO_2 est importante dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, l'oxygène régule de nombreuses voies de signalisation, ainsi que l'expression de certains gènes (Pouysségur *et coll.*, 2006). De plus, si la pO_2 cellulaire est trop élevée, il y a une augmentation du niveau d'espèces activées de l'oxygène (ROS) ce qui provoque un stress oxydatif et l'apparition de dommages à l'ADN et cellulaires. Inversement, une trop faible pO_2 provoque une production insuffisante d'ATP et les fonctions cellulaires ne

sont pas assurées. Le corps humain doit donc maintenir une pression en oxygène constante et adaptée aux cellules.

Une faible pO_2 protège les cellules souches humaines en diminuant les dommages chromosomiques due aux ROS (Forsyth *et coll.*, 2006). De plus, l'hypoxie stimule non seulement l'autorenouvellement des cellules souches mais aussi leur plasticité. En effet, l'hypoxie augmente l'expression des gènes Oct4 (Octamer-4) et Rex-1, codant pour le maintien de la multipotence des cellules souches (Grayson *et coll.*, 2006). La même observation est faite pour les cellules souches embryonnaires humaines et murines (Forsyth *et coll.*, 2006 ; Gibbons *et coll.*, 2006). Le mécanisme d'action de l'hypoxie sur les CSMs n'est pas totalement connu, et la surexpression d'Oct4 pourrait passer par le facteur de transcription HIF-2 α (Hypoxia Induced Factor-2 α) (Covello *et coll.*, 2006).

De plus, les CSHs en faible pO_2 possèdent une meilleure capacité à reconstituer la moelle osseuse (Jang et Sharkis, 2007) et le compartiment hématopoïétique (Parmar *et coll.*, 2007) d'une souris irradiée. A l'inverse, la différenciation ostéogénique des CSMs est diminuée sous 3% d' O_2 (D'Ippolito *et coll.*, 2006).

2.3. Rôles des niches

2.3.1. Autorenewement et pluripotence des cellules souches

2.3.1.1. L'autorenouvellement

L'autorenouvellement des cellules souches est défini par leur capacité à se reproduire indéfiniment sans perdre leur potentialité de différenciation. Au sein des niches, une organisation topographique précise de ces cellules avec les cellules de soutien environnantes est importante pour leur homéostasie. L'attachement polarisé des cellules souches par les cellules de soutien, ou par la matrice extracellulaire *via* des complexes de jonction, oriente la division et le devenir de ces cellules. La localisation de certains facteurs au niveau des niches peut moduler la division cellulaire, comme la N-cadhérine et la β -caténine dans les niches médullaires. La division cellulaire peut alors être symétrique ou asymétrique, ce qui détermine le destin des cellules filles. La division symétrique permet l'autorenouvellement des cellules souches en formant deux cellules filles identiques. A l'inverse, la division asymétrique génère deux cellules filles inégales : la première est destinée à l'autorenouvellement de la cellule souche et la seconde à être différenciée.

Au cours de la division cellulaire dans les niches, l'un des pôles du faisceau mitotique est orienté vers les cellules de soutien. De cette façon, la cellule fille reste dans la niche et retient l'identité de la cellule souche. Cette cellule conserve alors l'allèle de l'ADN initial, afin d'éviter toute corruption de la séquence au cours du processus de réplication. A l'inverse, la seconde cellule fille est déplacée à l'extérieur de la niche où elle s'éloigne des signaux d'autorenouvellement, ce qui initie sa différenciation (Deng et Lin, 1997 ; Yamashita *et coll.*, 2003).

2.3.1.2. La pluripotence des cellules souches

La pluripotence est une des propriétés centrales des cellules souches. Son maintien nécessite la stimulation des cellules souches par les protéines LIF (Leukemia Inhibitory Factor), BMPs (Bone Morphologic Proteins) [pour revue, Chambers et Smith, 2004 ; Silva et Smith, 2008], Wnt (ou wingless chez la drosophile) et autres facteurs de croissance. Les liaisons des ligands sur leurs récepteurs spécifiques activent les voies de transduction des STAT, SMAD, MAPK conduisant à la transduction des facteurs de pluripotence Nanog, Sox2, Oct4 et bien d'autres (Figure 3).

2.3.1.3. La voie LIF/ gp130/ STAT3

La protéine LIF est une cytokine pléiotropique de la famille de l'IL-6. Elle maintient le statut souche des CSMs et d'autres cellules souches. En effet, LIF active les voies de signalisation inhibitrices de la différenciation (Smith, 2001 ; Burdon *et coll.*, 2002). LIF peut également activer ou réprimer les fonctions des ostéoblastes et ostéoclastes au sein des niches médullaires. La bipotence du LIF suggère que l'environnement cellulaire et le stade de développement de la cellule cible influence la nature de la réponse suite à la stimulation par le LIF. Les mécanismes d'action du LIF dans l'autorenouvellement des CSMs sont inconnus, mais le LIF stimule la boucle paracrine avec les cellules voisines de production du LIF.

Le récepteur du LIF est un hétérocomplexe composé de la protéine gp130 et du récepteur LIF (LIFR). Les tyrosines kinases Janus kinases (JAKs) sont constitutivement liées au domaine intracellulaire du LIFR. Lorsque le LIF se fixe sur son récepteur, JAK phosphoryle les protéines gp130 et LIFR. La protéine JAK recrute et phosphoryle alors les protéines STAT1/3 (Signal Transducers and activators of transcription) via leurs domaines SH2 (Stahl *et coll.*, 1995). Les protéines STAT s'hétérodimérisent et transloquent vers le noyau afin d'y assurer

leur fonction de facteur de transcription (Figure 3). L'activation de la voie de transduction de STAT conduit à l'activation du cycle cellulaire et au maintien de l'état indifférencié des cellules souches.

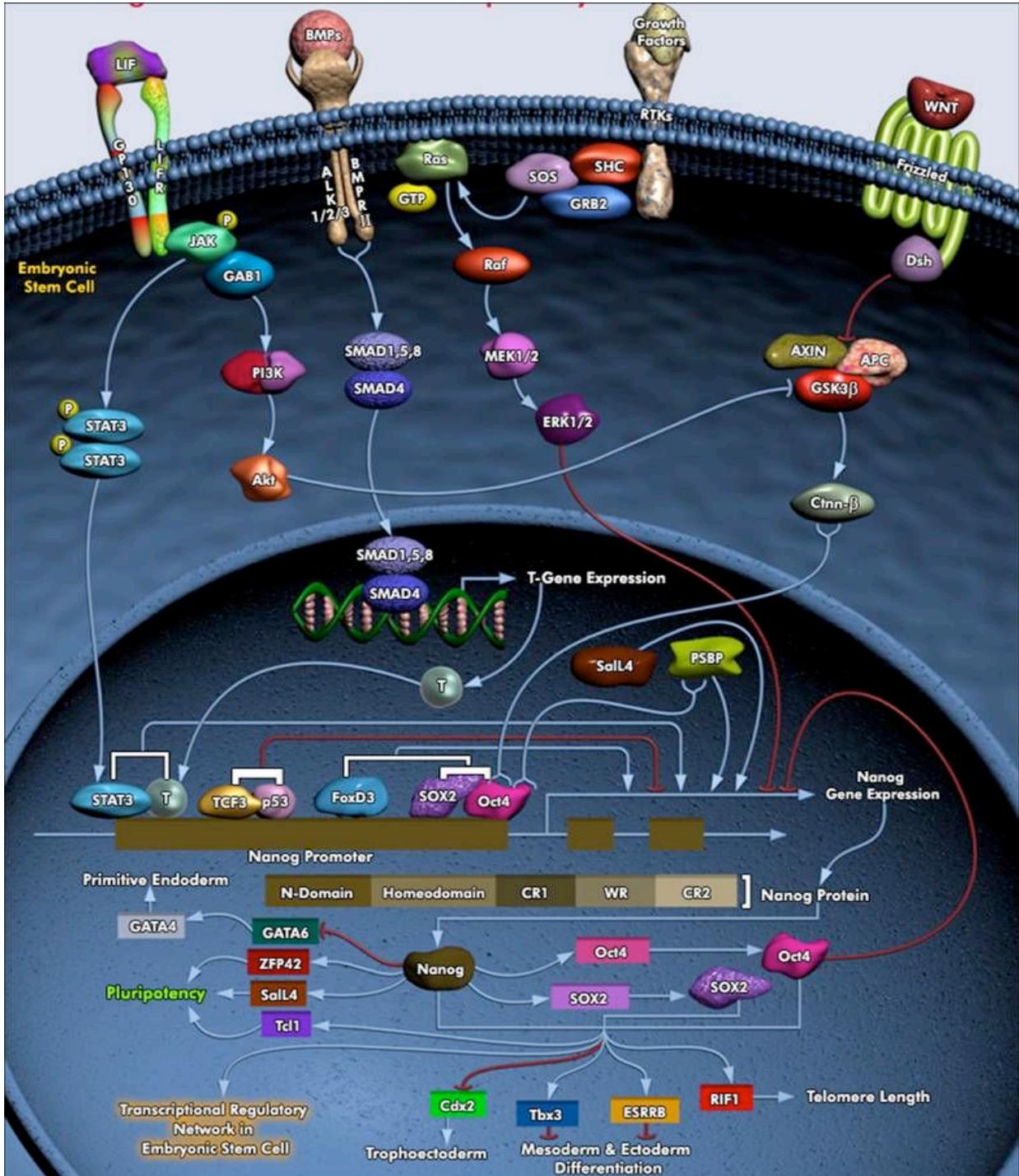


Figure 3 : Voies de signalisation aboutissant à l'autorenouvellement et la pluripotence des cellules souches (Schéma de QIAGEN).

2.3.1.4. La voie BMP/Smad

Le LIF n'est pas le seul facteur indispensable à la régulation de l'autorenouveaulement des cellules souches. Les protéines BMP (Bone Morphogenetic Protein), et plus particulièrement la BMP4, semblent également impliquées. Les protéines BMPs appartiennent à la famille du TGF- β (Transforming Growth Factor β) (Shi et Massagué, 2003) . Elles se fixent sur leur récepteur BMPRI et activent leurs effecteurs Smads, MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Canalis, 2003).

La combinaison des signaux induits par le LIF et BMP4/2 augmente sensiblement le taux d'autorenouveaulement des cellules ES non différenciées (Mitsui *et coll.*, 2003). De plus, cette association entre le LIF et les BMPs permet de maintenir le potentiel de différenciation, leur carence, par exemple, conduit à la différenciation neurale (Ying *et coll.*, 2003). Cependant, l'effet de la voie BMP/SMAD sur l'autorenouveaulement reste dépendant de l'état d'activation de la voie de signalisation du LIF.

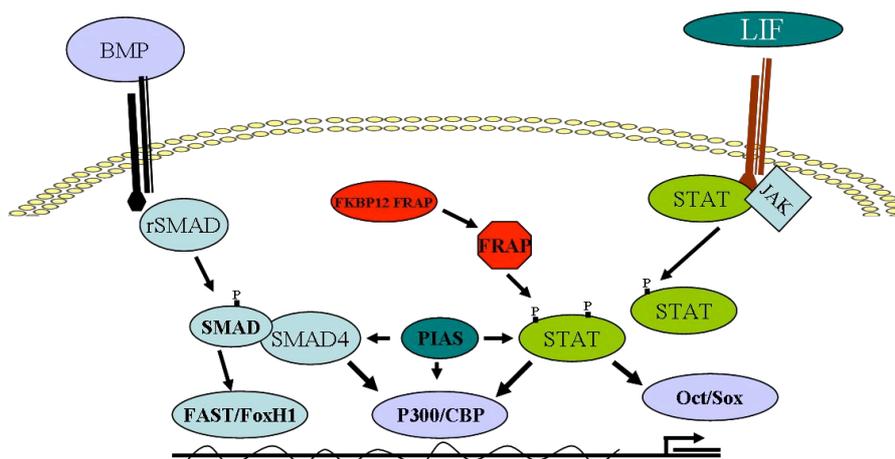


Figure 4 : Interconnexions entre les voies de signalisation LIF et BMP.

Il y a donc des interconnexions entre les voies de signalisation de LIF et des BMPs. Les interactions possibles entre la voie Jak-STAT et BMP/SMAD peuvent intervenir à plusieurs niveaux (Figure 4).

2.3.1.5. La voie Wnt/ β caténine/ TCF

La β -caténine se lie à des protéines d'adhérence nommées cadhérines au niveau des jonctions cellulaires. L'excédant de β -caténine produit est constamment dégradé par le protéasome (Figure 5A). L'activation de la cascade de signalisation Wnt/ β -caténine se produit lorsqu'un ligand de la famille Wnt, se lie à son récepteur Frizzled (Fz). L'interaction ligand-récepteur

stimule une cascade d'événements moléculaires dont le recrutement du corécepteur LRP (Lipoprotein Receptor Protein), la stabilisation et l'accumulation de β -caténine. En effet, le complexe récepteur-corécepteur Fz-LRP recrute à la membrane plasmique certains composants du complexe stimulant la dégradation de β -caténine, le complexe APC/Axin/GSK3 β (Adenomatous Polyposis Coli/Axin/ Glycogen Synthase Kinase 3b). L'excès de β -caténine cytoplasmique peut alors se transloquer vers le noyau et s'associer aux facteurs de transcription de la famille LEF/TCF (Lymphoid Enhancer Factor-1) (Figure 5B) (Daniels et Weis, 2005) . Cette stabilisation induit alors l'augmentation de la transcription des gènes nécessaires à la prolifération comme c-Myc et cycline D1 (Duncan *et coll.*, 2005) et au maintien de la pluripotence comme Oct3/4 et Nanog.

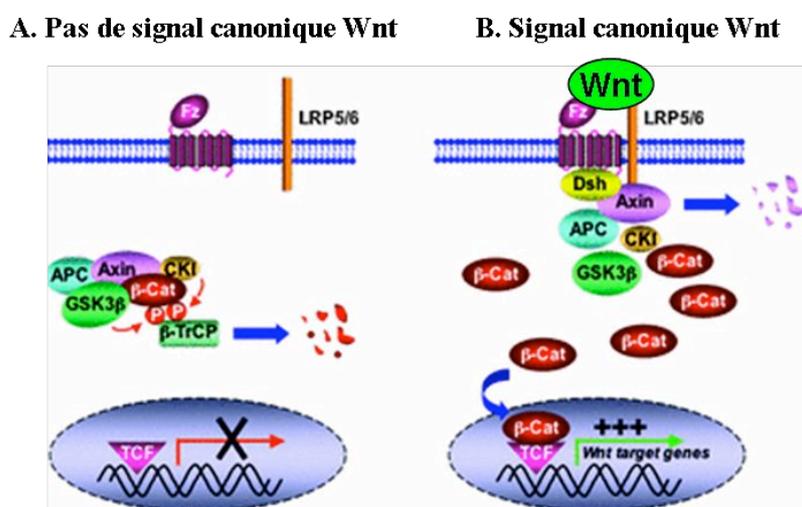


Figure 5 : Voie de signalisation Wnt/ β -caténine (D'après Pinto et Clevers, 2005) .

(A) En l'absence de Wnt, la β -caténine est dégradée par le protéasome. (B) En présence de Wnt, la β -caténine se stabilise et s'accumule dans le cytoplasme. Le surplus transloque dans le noyau où la β -caténine s'associe à différents facteurs de transcription.

Il y a alors prolifération des cellules souches tout en maintenant leur statut immature (Reya *et coll.*, 2003 ; Murdoch *et coll.*, 2003 ; Baba *et coll.*, 2006 ; Trowbridge *et coll.*, 2006). Ces cellules sécrètent elles-mêmes Wnt qui agit en boucle autocrine (Reya *et coll.*, 2003). Cette voie de signalisation est également importante pour la survie des CSHs fœtales et néonatales. En effet, la délétion expérimentale du marqueur de cellules souches fœtales Sox17 provoque l'expression de l'antagoniste de Wnt, Dickkopf-1 (Dkk1) et par conséquent la mort des cellules CSHs. De plus, la perte de l'effecteur de la voie Wnt, la β -caténine, cause une diminution de la reconstitution de la réserve cellulaire à long terme (Zhao *et coll.*, 2007).

Les CSMs expriment un grand nombre des membres de la voie Wnt comme, Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt11 et Wnt16, mais également Fz2, Fz3, Fz4, Fz5, Fz6 ainsi que Dkk1. Les fonctions de ces protéines dans l'autorenouvellement de ces cellules ne sont pas toutes définies. Cependant, la présence de Wnt3a dans le milieu de culture des CSMs provoque une surexpression de la β -caténine et une augmentation de la prolifération de ces cellules (De Boer *et coll.*, 2004).

2.3.1.6. Les facteurs de transcription : Oct4, Sox2 et Nanog

Les facteurs de transcription Oct4, Nanog et Sox2 sont impliqués dans la multipotence et l'autorenouvellement des cellules souches non différenciées (Figure 3) (Li *et coll.*, 2006). Ces trois facteurs de transcription interagissent ensemble pour une meilleure efficacité de leur fonction dans le maintien de la multipotence (Jauch *et coll.*, 2008).

La protéine Oct4 a été identifiée comme l'un des facteurs de transcription les plus précoces au cours du développement embryonnaire. Elle est fréquemment utilisée comme marqueur de cellules indifférenciées. Oct4 intervient dans la maintenance de la pluripotence cellulaire (Nichols *et coll.*, 1998). De plus, l'inhibition de l'expression d'Oct4 entraîne la perte de la pluripotence des cellules ES, puis leur différenciation vers le trophectoderme (Nichols *et coll.*, 1998). La protéine Oct4 est synthétisée dans le cytosol puis elle est transportée dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire. Le signal de localisation nucléaire d'Oct4 est nécessaire à son activité de transcription (Pan *et coll.*, 2004), tout comme deux domaines de transactivation associés aux domaines de liaison à l'ADN (Pan *et coll.*, 2002).

Sox2 est un facteur de transcription impliqué dans l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires. Ce facteur est également important pour le maintien de la pluripotence de ces cellules. Sox2 est également impliqué dans l'embryogénèse, la neurogénèse, la formation de l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme (Boyer *et coll.*, 2005). Sox2 n'agit pas seul, il forme un complexe avec d'autres facteurs de transcription tels que Nanog, Oct1 ou Oct4 (Yuan *et coll.*, 1995). Le complexe Nanog/Oct4/Sox2 s'autorégule en fonction de l'activation de chaque facteur le constituant.

Le facteur Nanog a été identifié par sa capacité à maintenir l'autorenouvellement en l'absence de LIF. De plus, la perte de fonction de Nanog cause la différenciation des cellules souches embryonnaires en d'autres types cellulaires (Lin *et coll.*, 2005). En effet, Nanog réprime l'expression des gènes de différenciation et se comporte comme un activateur du promoteur d'Oct4. Comme décrit précédemment, Nanog forme un complexe avec d'autres facteurs de transcription Oct4 et Sox2. Nanog agit en synergie avec le LIF. Cependant, il ne semble moduler ni la voie LIF, ni la voie BMP. Les cibles de Nanog ne sont pas clairement identifiées. Il semble toutefois que la voie de signalisation TGF β soit régulée par Nanog.

Le facteur de transcription c-Myc est lié à de très nombreuses fonctions cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la croissance, la différenciation et le métabolisme (Schmidt, 1999). Ce facteur est fortement exprimé dans les cellules en prolifération alors qu'il est quasiment absent dans les cellules quiescentes.

2.3.1.7. La voie Notch

La voie de signalisation de Notch participe au maintien de la pluripotence des cellules souches (Calvi *et coll.*, 2003 ; Duncan *et coll.*, 2005). Il existe quatre récepteurs Notch (Notch 1 à 4) et cinq ligands (Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4, Jagged-1 et Jagged-2). Lorsque le ligand se fixe sur le récepteur Notch, ce dernier subit deux clivages protéolytiques consécutifs (Figure 6). Le premier est dépendant des métallopeptidases membranaires (ou MMP). Les protéines ADAM10 (A Disintegrin And Metallopeptidase 10) ou TACE/ADAM17 clivent le domaine extramembranaire du récepteur. Le second est un clivage endomembranaire du récepteur par un complexe γ -sécrétase. Il permet la libération du domaine NICD (Notch IntraCellular Domain) qui se transloque au noyau (Figure 6). Le NICD s'associe alors aux facteurs de transcription CSL et à ses coactivateurs (CBP/p300), ce qui permet l'expression des gènes cibles de Notch : Hes-1 et Hey-2. Par ailleurs, l'hypoxie stabilise la protéine HIF-1 α qui se lie au NICD et augmente ainsi son activité transcriptionnelle pour les gènes Hes-1 et Hey-2, simulant le maintien du statut indifférencié et pluripotent des cellules souches (Gustafsson *et coll.*, 2005).

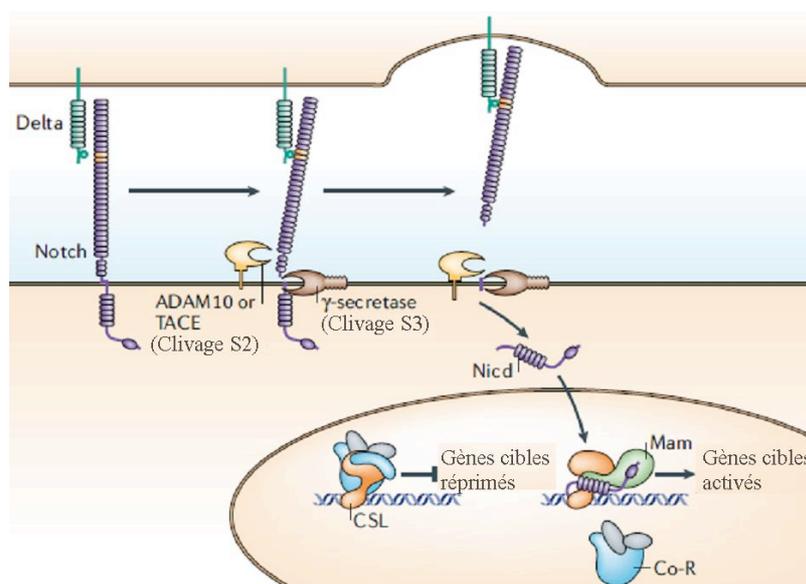


Figure 6 : Voie d'activation de Notch-1 (D'après Bray, 2006).

La fixation du ligand Delta sur le récepteur Notch provoque deux clivages protéiques constitutifs, le clivage S2 par la protéine ADAM10 et le clivage S3 par la γ -sécrétase. Le fragment NICD ainsi libéré se transloque au noyau où il régule la transcription de ces gènes cibles.

Les interactions entre les ostéoblastes et les CSHs contrôlent le nombre de CSHs dans les niches médullaires (Calvi *et coll.*, 2003 ; Duncan *et coll.*, 2005 ; pour revue, Chiba, 2006). En effet, les ostéoblastes expriment le ligand Jagged-1 qui se fixe sur les récepteurs Notch des CSHs et stimule la prolifération des CSHs dans les niches médullaires (Calvi *et coll.*, 2003). Ces interactions activent la protéine c-Myc et permettent alors une reprise du cycle cellulaire des CSHs (Sato *et coll.*, 2004). De plus, la voie de Notch est nécessaire à la signalisation par Wnt pour le maintien des CSHs non différenciées (Duncan *et coll.*, 2005). En effet, l'expression constitutive du NICD (Varnum-Finney *et coll.*, 2000 ; Stier *et coll.*, 2002) ou de sa cible Hes-1 (Kunisato *et coll.*, 2003) inhibe la différenciation des CSHs.

Le rôle de Notch dans la différenciation des CSMs est encore très controversé. En effet, il a été décrit que l'activation constitutive de la voie Notch-1 dans des MC3T3 (MC3T3 surexprimant le fragment NICD) affectait la différenciation ostéogénique de ces cellules (Sciaudone *et coll.*, 2003). A l'inverse, des travaux plus récents démontrent l'importance de Notch-1 dans la différenciation ostéogénique de ces cellules (Tezuka *et coll.*, 2002), Notch augmentant le potentiel des BMP-2 (Nobta *et coll.*, 2005). Les effets différents de l'activation de Notch-1 pourraient être dépendants de la période d'activation de Notch-1. Une activation courte et transitoire de la voie de transduction de Notch-1 participe à la différenciation

ostéogénique (Tezuka *et coll.*, 2002 ; Nobta *et coll.*, 2005). A l'inverse, une activation longue et continue semble inhiber l'engagement ostéogénique des cellules (Sciaudone *et coll.*, 2003).

2.3.2. Quiescence / Sénescence

La cellule quiescente présente un arrêt en G0, mais, cet arrêt est réversible quand les facteurs de croissance adéquats sont à nouveau disponibles. La quiescence des cellules est identifiable par leur capacité de rétention d'intercalant de l'ADN comme le BrdU. A l'inverse, la sénescence cellulaire se présente sous forme d'un arrêt stable et irréversible du cycle cellulaire en fin de phase G1 (avant le point de restriction). La cellule sénescence devient donc insensible à la stimulation par des facteurs de croissance.

Les cellules souches mésenchymateuses entrent en quiescence après leur phase de croissance dans les niches médullaires. La quiescence réplivative est le moyen le plus simple de limiter le nombre de mutations et d'erreurs de réplication. En effet, la longueur des télomères diminue au fur et à mesure des divisions de la cellule pouvant provoquer des erreurs en fin de réplication. Ces télomères agissent comme des « horloges mitotiques » en contrôlant le nombre de division cellulaire. Elles arrêtent la prolifération à partir d'un seuil critique de taille des télomères et en l'absence d'expression de la télomérase hTERT (Sherr et DePinho, 2000). Il est à noter que les CSMs ne peuvent réparer les télomères car ces cellules n'expriment pas de télomérase (Banfi *et coll.*, 2002). A l'inverse, la longueur des télomères est maintenue par l'expression de la télomérase dans les CSHs.

La sénescence réplivative peut également être initiée par des signaux de dommage de l'ADN, qui aboutissent à l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire comme p53, p16^{INK4a} et pRb (protéine du rétinoblastome). Les cellules vont alors soit arrêter leur cycle cellulaire sous la dépendance de p21^{Waf1}, soit, entrer en sénescence (Liu, 1999 ; Cerni, 2000) .

Les niches médullaires retiennent les cellules souches dans un statut de quiescence. En effet, les ostéoblastes expriment la protéine l'angiopoïétine-1, l'Ang-1. Les CSHs et les cellules endothéliales expriment quant à elles le récepteur à tyrosine kinase Tie-2. Les interactions Tie-2/Ang-1 permettent alors d'induire l'adhésion des CSHs aux ostéoblastes et de maintenir les CSHs dans un statut de quiescence (Arai *et coll.*, 2004).

3. LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES

3.1. Identification des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses ont été identifiées pour la première fois dans la moelle osseuse par Friedenstein et ses collaborateurs (Friedenstein *et coll.*, 1970). Cependant, ces cellules peuvent être également isolées d'autres sources comme la moelle trabéculaire (Tuli *et coll.*, 2003), la membrane synoviale (De Bari *et coll.*, 2001), le muscle (Bosch *et coll.*, 2000), le tissu adipeux (Boquest *et coll.*, 2005), le derme (Young *et coll.*, 2001) et le périoste (De Bari *et coll.*, 2001).

Les CSMs sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD90⁺, CD44⁺, CD49⁺, CD29⁺ (intégrine β 1), CD71⁺, CD73⁺, CD105⁺, STRO1⁺, CD106⁺, CD120⁺ et CD124⁺ et les molécules HLA de classe I. Cependant, ces cellules n'expriment ni les molécules HLA de classe II (Boiret *et coll.*, 2005) ni les marqueurs CD14⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD117⁻ (Reyes *et coll.*, 2001 ; Pittenger *et coll.*, 1999 ; Zvaifler *et coll.*, 2000 ; Hung *et coll.*, 2002).

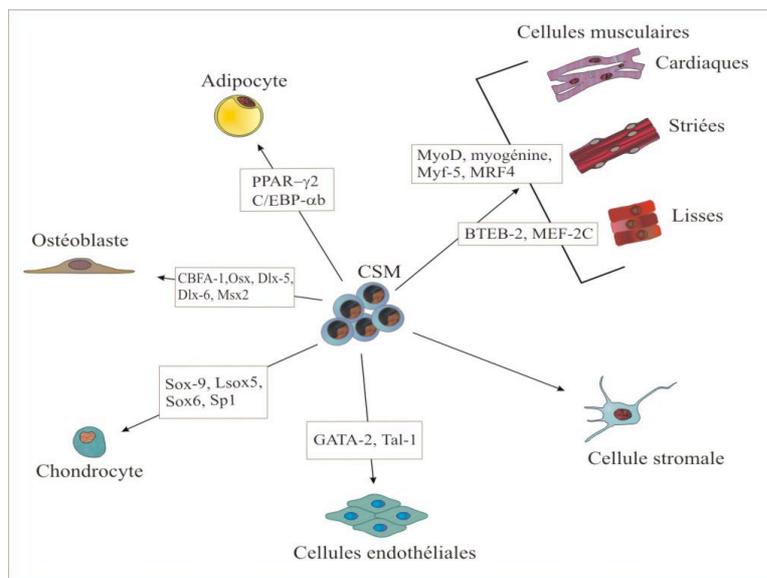


Figure 7 : Voies de différenciation décrites pour les cellules souches mésenchymateuses.

Les CSMs sont des cellules pluripotentes pouvant se différencier en ostéoblastes, en chondrocytes, en tissu adipeux/adipocytes, en cellules stromales et musculaires (Pittenger *et coll.*, 1999). Elles peuvent également se différencier en cellules endothéliales (Reyes *et coll.*, 2002) et neurales (Woodbury *et coll.*, 2000) (Figure 7). Elles présentent donc un potentiel de différenciation varié. Nous développerons uniquement les CSMs issues de la moelle osseuse

et les mécanismes de différenciation ostéogénique, chondrogénique et adipocytaire, qui sont les principales voies de différenciation des CSMs.

Les CSMs possèdent également la capacité de transdifférenciation. Le terme de transdifférenciation signifie qu'une cellule souche d'un tissu donné peut se différencier en une cellule spécialisée d'un autre tissu, issu ou non du même feuillet embryonnaire. Cependant, la transdifférenciation permet également à une cellule différenciée de passer à un autre type de cellule différenciée sans passer par une étape de dédifférenciation. En effet, il a été démontré que, par exemple, des cellules adipocytaires peuvent acquérir un phénotype ostéoblastique différencié (Bennett *et coll.*, 1991). Par ailleurs, la surexpression du facteur de transcription *Msx1* dans des myotubes différenciés entraîne l'apparition de cellules mononuclées. Ces cellules peuvent alors s'orienter vers une différenciation ostéoblastique, chondrocytaire ou même musculaire (Odelberg *et coll.*, 2000). De plus, des précurseurs des oligodendrocytes peuvent être reprogrammés, après dédifférenciation, en cellules souches neurales. Les précurseurs des oligodendrocytes semblent alors capables de donner naissance à des oligodendrocytes, astrocytes et des neurones (Kondo et Raff, 2000). Par ailleurs, des cellules épithéliales adultes injectées dans des blastocystes murins peuvent contribuer à la génération de plusieurs tissus, témoignant de la capacité de ces cellules de changer de phénotype (Liang et Bickenbach, 2002).

3.2. Différenciation des CSMs

3.2.1. Différenciation ostéoblastique *in vivo*

La formation du tissu osseux *in vivo* est réalisée en quatre étapes. Dans un premier temps, les CSMs migrent au niveau de l'os au cours du développement embryonnaire ou en cas de fracture. Ensuite, les cellules prolifèrent et se condensent avant de s'engager dans la voie ostéoblastique. Les cellules ostéoprogénitrices se différencient alors en ostéoblastes fonctionnels. Les ostéoblastes sont responsables de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse au cours de la croissance et de sa réparation tout au long de la vie.

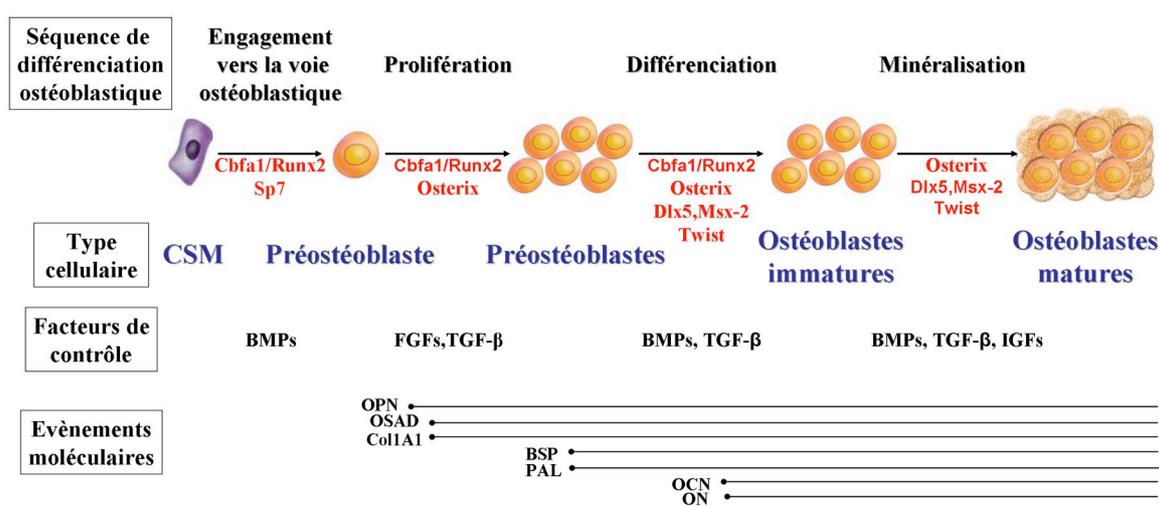


Figure 8 : Séquence de différenciation ostéoblastique des CSMs.

Les différentes étapes de l'ostéogénèse sont représentées schématiquement. Les principaux facteurs de transcription sont notés en rouge au-dessous des flèches pour chacune des étapes de la différenciation. Les profils d'expression des différents facteurs de croissance et de différenciation sont indiqués en dessous (Facteurs de contrôle). Les protéines caractéristiques de la matrice extracellulaire sont indiquées dans la partie basse du schéma.

3.2.1.1. L'engagement et la prolifération

Plusieurs types d'interactions cellulaires ont un rôle inducteur sur la différenciation ostéoblastique *in vivo*. Par exemple, des molécules d'adhérence intercellulaire, telle que la N-cadhérine, sont impliquées dans l'induction des gènes de différenciation, dont Cbfa1/Runx2, dans les ostéoblastes (Haÿ *et coll.*, 2000). Certains facteurs locaux sont également importants dans le recrutement, la différenciation et la fonction de l'ostéoblaste. Les facteurs les plus importants sont ceux produits par les ostéoblastes et qui s'incorporent dans la matrice osseuse. Il s'agit des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) qui sont produits par les ostéoblastes. Les BMPs (BMP-2, -4, -6, -7 et -9) sont membres de la famille du TGF-β et jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la formation osseuse (Yamaguchi *et coll.*, 1996). La BMP-2 induit l'acétylation du principal facteur ostéogénique Cbfa1/Runx2 par la protéine p300 (Jeon *et coll.*, 2006). Ce facteur est essentiel dans l'engagement et la différenciation des ostéoblastes (Ducy *et coll.*, 1997). En effet, ce facteur possède un domaine de liaison à l'ADN de type Runt/Cbfa et se lie à un site consensus présent dans le promoteur de nombreux gènes dont la chaîne α1 du collagène de type I, l'ostéocalcine (OCN) et l'ostéopontine (OPN). Son acétylation augmente alors l'activité transcriptionnelle de Cbfa1/Runx2 dans les CSMs et les engage vers la voie ostéoblastique (Jeon *et coll.*, 2006).

Une fois devenues des préostéoblastes, les cellules prolifèrent en présence de FGFs et de TGF- β (Figure 8). Les FGFs sont des régulateurs importants de la prolifération et de la fonction des ostéoblastes. Ils sont synthétisés par les ostéoblastes et conservés dans la matrice extracellulaire grâce à leur affinité pour les protéoglycanes. *In vivo*, les FGF-1 et FGF-2 stimulent la formation osseuse en augmentant la synthèse de phosphatase alcaline et d'ostéocalcine.

Ces facteurs stimulent également l'expression de gènes ostéoblastiques tel que l'autre facteur de transcription indispensable à l'ostéogenèse et au développement osseux, Ostérix (Nakashima *et coll.*, 2002). La protéine Osx intervient plus tardivement que Cbfa1/Runx2. A l'inverse de Runx2 qui détermine l'engagement des progéniteurs vers la voie de différenciation ostéogénique ou chondrocytaire, Osx n'intervient qu'au cours de la différenciation ostéogénique sous la dépendance des BMPs (Bone Morphogenic Proteins). L'expression d'Osx permet ainsi de distinguer la voie ostéogénique de la voie chondrocytaire. La présence des facteurs de transcription Cbfa1/Runx2 et Osx permet alors l'expression des protéines ostéoblastiques telles que le collagène de type I (Col1A1), l'ostéopontine et l'ostéoadhérine (OSAD) (Figure 8).

3.2.1.2. La différenciation ostéogénique

A la fin de la prolifération des préostéoblastes, les BMPs stimulent l'expression de la phosphatase alcaline (PAL) et de l'ostéonectine (ON) dans les ostéoblastes (Figure 8) (Yamaguchi *et coll.*, 1996).

Certaines protéines homéotiques, comme Dlx5 (Ryoo *et coll.*, 1997) et Msx2 (Liu *et coll.*, 1999), jouent également des rôles essentiels et spécifiques dans l'ostéogenèse (Ryoo *et coll.*, 2006). Elles induisent l'expression de Cbfa1/Runx2 et d'Osx indépendamment pendant la signalisation des BMPs (Shirakabe *et coll.*, 2001). Le facteur de transcription Dlx5 régule ainsi l'expression de la sialoprotéine osseuse (BSP) et de l'ostéocalcine (OCN) mais également l'activité de Msx2. De plus, la surexpression de Dlx5 est suffisante pour induire l'expression de Runx2 en l'absence de BMPs (Ryoo *et coll.*, 2006). A l'inverse, l'inactivation du gène Dlx5, tout comme l'inaction de Msx2, induit, chez la souris, un retard d'ossification et une ostéogénèse anormale (Acampora *et coll.*, 1999). A l'inverse, la surexpression de Msx2 accélère l'ossification membranaire. Ainsi, la protéine Msx2 possède un rôle crucial dans la détermination et la différenciation ostéoblastiques.

Au contraire, le facteur de transcription Twist est un régulateur négatif de l'ostéof ormation car son inactivation fonctionnelle augmente la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Yousfi *et coll.*, 2001).

3.2.1.3. Formation de la matrice extracellulaire osseuse

Tout au long de la différenciation ostéogénique, les cellules expriment des protéines de la matrice extracellulaire osseuse (Figure 8). Cette dernière est principalement composée de collagène de type I (Col1A1) qui représente 90% des macromolécules de cette matrice organique. La Col1A1 est synthétisée dès les étapes précoces de la différenciation ostéogénique tout comme l'ostéopontine qui facilite l'adhésion des ostéoclastes à la matrice extracellulaire (Figure 8). L'ostéoadhérine/ostéomoduline (OSAD) est également exprimée pendant les stades précoces de différenciation ostéoblastique. Cette protéoglycane améliore l'adhésion des cellules à la matrice osseuse (Gehron Robey, 1989) . L'ostéocalcine n'est exprimée qu'à partir de la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes. Cette hormone protéique favorise la fixation du calcium à la matrice osseuse et participe ainsi à la minéralisation des ostéoblastes.

En effet, la fonction principale des ostéoblastes est la minéralisation de la matrice osseuse. Les cellules ont donc besoin d'un apport suffisant de calcium et de phosphate. Le transport du calcium extracellulaire vers l'ostéoblaste se fait par une diffusion passive. Il peut également se faire par un transfert actif grâce à des pompes calciques présentes dans la membrane des cellules.

Les ions phosphates sont également transportés de façon passive et active. Dans ce cas, les systèmes de transport du phosphate inorganique (Pi) sont des pompes dépendantes du sodium, nommées Pit-1 et Pit-2 (type III Pi Transport system) (Suzuki *et coll.*, 2006). De plus, les ostéoblastes synthétisent de façon précoce la phosphatase alcaline (PAL). Cette enzyme hydrolytique permet de détacher les groupements phosphates et de participer ainsi à la minéralisation des cellules. La mesure de l'activité de cette enzyme permet de déterminer le statut de différenciation des CSMs *in vitro*. En effet, l'activité de la PAL augmente au cours de la différenciation ostéoblastique.

Une fois dans les ostéoblastes, le phosphate inorganique se lie au calcium pour former de l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ constituant ainsi la partie minérale de l'os. L'ostéopontine relie alors l'hydroxyapatite aux cellules osseuses. Cette minéralisation osseuse est observable

après une coloration rouge alizarine. En effet, ce colorant se fixe sur les nodules minéraux et, tout comme l'activité de la PAL, l'intensité de coloration est proportionnelle au statut de différenciation.

3.2.2. Différenciation chondrogénique *in vivo*

De nombreux facteurs solubles induisent la différenciation chondrogénique des CSMs et initient la synthèse de la matrice extracellulaire cartilagineuse, comme le TGF- β (Johnstone *et coll.*, 1998) et les BMPs (Majumdar *et coll.*, 2001 ; Shirasawa *et coll.*, 2006). Ces facteurs de croissance stimulent la condensation des CSMs. De plus, la liaison de ces molécules sur leurs récepteurs active les voies de transduction des SMAD et MAPK.

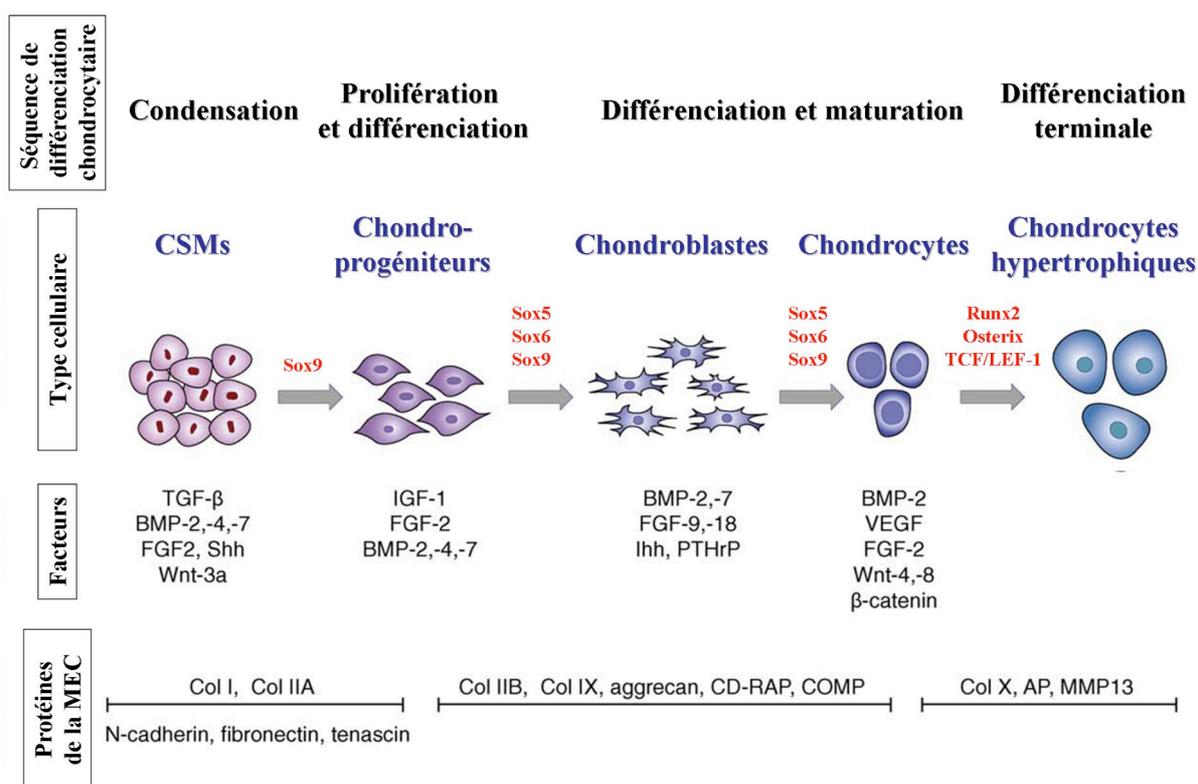


Figure 9 : Séquence d'événements conduisant à la différenciation des CSMs en chondrocytes (D'après Vinatier *et coll.*, 2009).

Les différentes étapes de la chondrogenèse sont représentées schématiquement. Les profils d'expression temporaire des différents facteurs de croissance et de différenciation sont indiqués en dessous (Facteurs). Les facteurs de transcription principaux de chaque étape de différenciation sont notés en rouge au dessus des flèches. Les protéines caractéristiques de la matrice extracellulaire aux différentes étapes sont indiquées dans la partie basse du schéma.

Après activation du facteur de transcription Sox9, les CSMs prolifèrent et deviennent des progéniteurs chondrocytaires (Figure 9). Les cellules perdent leur morphologie fibroblastique

et expriment des composants de la matrice extracellulaire cartilagineuse tels que, dans un premier temps, les collagènes de type I et II, ce dernier étant le plus exprimé dans cette même matrice (van Osch *et coll.*, 2002). Sous l'influence des facteurs de transcription Sox5, Sox6 et Sox9, les chondroprogéniteurs se différencient en chondroblastes (Figure 9). Ces cellules expriment alors des composants de la matrice extracellulaire cartilagineuse comme les glycosaminoglycanes, l'aggrécane (qui représente 90% des protéoglycanes de la matrice extracellulaire du cartilage) et les collagènes de type IX et XI (Barry *et coll.*, 2001). La maturation chondrocytaire est également stimulée par les facteurs de transcription Sox5, Sox6 et Sox9 (Figure 9). Ces étapes de différenciation chondrocytaires sont sous l'influence des facteurs solubles tels que les BMP-2 et -7, les FGFs et les protéines de la famille Wnt.

La différenciation terminale des chondrocytes en chondrocytes hypertrophiques est transcrite par les facteurs Runx2, Osterix et TCF/LEF-1. Les chondrocytes hypertrophiques expriment alors des protéines ostéogéniques telles que le collagène de type X et la phosphatase alcaline. La MMP13 dégrade les collagènes afin de permettre l'insertion des ostéoblastes dans les interstices ainsi formés. Cette protéine est présente au moment de la transition entre l'hypertrophie chondrocytaire et la néoformation osseuse (Figure 9).

In vivo, le cartilage articulaire n'est pas vascularisé, les chondrocytes reçoivent donc l'oxygène et les nutriments par diffusion passive depuis le fluide synovial et l'os sous-chondral. De plus, une faible tension en oxygène favorise la prolifération, la différenciation et l'activité des cellules chondrogéniques (Robins *et coll.*, 2005 ; Wang *et coll.*, 2005). L'hypoxie stabilise certains facteurs de transcription comme HIF (Hypoxia inducible factor). La protéine HIF-1 α , par exemple, est essentielle à l'arrêt de la croissance et à la survie des chondrocytes (Schipani *et coll.*, 2001). Ces facteurs vont alors se transloquer dans le noyau et se fixer sur les éléments de réponse hypoxique (HRE pour Hypoxic Responsive Element) au niveau des promoteurs. Ces facteurs initient alors la transcription de gènes (Guillemin et Krasnow, 1997) permettant l'adaptation de ces cellules à la faible tension en oxygène (Fedele *et coll.*, 2002).

3.2.3. Différenciation adipocytaire *in vivo*

La différenciation adipocytaire des CSMs est un processus séquentiel au cours duquel la cellule progénitrice devient tout d'abord un adipoblaste sous l'influence des voies Wnt et Fos B (Figure 10). La composition de la matrice extracellulaire (MEC) évolue alors d'une structure riche en fibronectine vers une lame basale essentiellement composée de laminine, collagène IV, protéoglycanes et d'entactine (Lilla *et coll.*, 2002). Ce remodelage matriciel modifie le cytosquelette, ce qui entraîne l'arrondissement des cellules. Les cellules vont alors subir une étape d'expansion clonale liée à une série de mitoses post-confluentes. Ces mitoses permettent l'expression des gènes de différenciation terminale. Ainsi, les cellules s'engagent dans la différenciation adipocytaire proprement dite et deviennent des préadipocytes (Figure 10) et s'engagent alors dans l'adipogenèse.

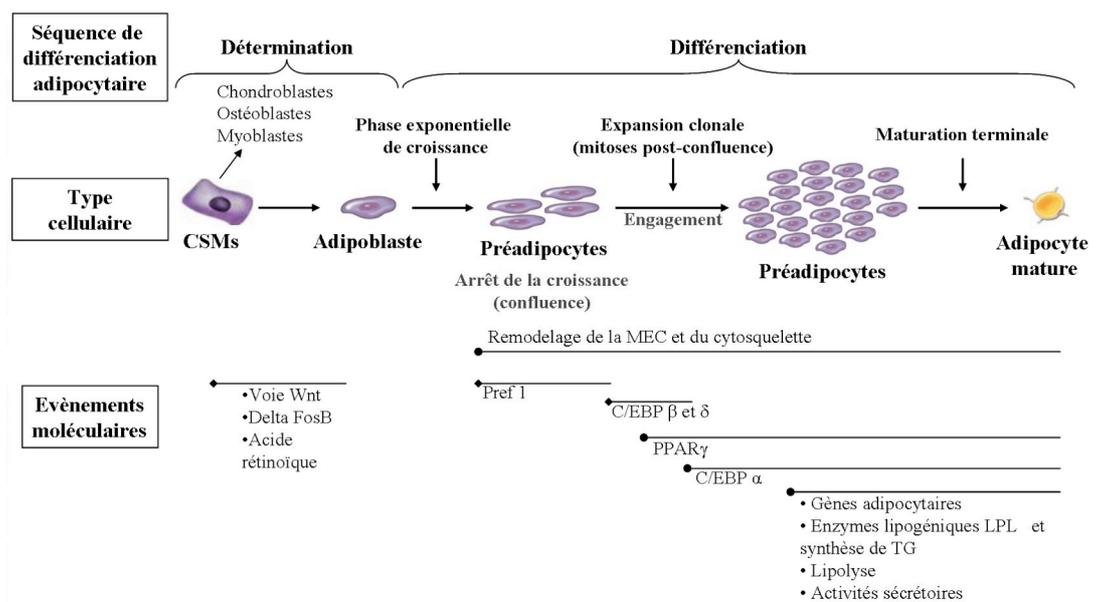


Figure 10 : Mécanisme de différenciation adipocytaire des cellules souches mésenchymateuses
(D'après Gregoire *et coll.*, 1998).

L'activation transitoire des facteurs de transcription C/EBP β/δ (CAAT/Enhancer Binding Protein) et PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) induit la maturation des préadipocytes [pour revue, Farmer, 2006 ; Rosen et MacDougald, 2006]. L'induction de C/EBPα se fait plus tardivement et permet alors de transcrire différents gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire tels que ceux codant pour la protéine de transport aux acides gras

AFBP/aP2 (Adipocyte Fatty acid Binding Protein) et la leptine mais également d'activer sa propre expression (Rosen *et coll.*, 2000) .

L'étape de maturation terminale permet aux adipocytes d'acquérir les propriétés métaboliques (enzymes lipogénétiques LPL ou LipoProtein Lipase) et sécrétoires des adipocytes matures (Rosen *et coll.*, 2000). Les adipocytes matures sont ainsi capables de synthétiser des triglycérides (TG) et de les hydrolyser. Les cellules accumulent alors des vacuoles lipidiques dans le cytoplasme (Figure 10).

3.3. Les propriétés biologiques des CSMs

3.3.1. Soutien de l'hématopoïèse

La principale fonction des cellules souches mésenchymateuses est leur contribution au soutien de l'hématopoïèse. En effet, les chercheurs montrent très rapidement que la transplantation de cellules de moelle osseuse permet la reconstitution des lignées hématopoïétiques (Till et McCulloch, 1961). De plus, les CSMs créent un tissu connectif dans les niches médullaires de CSHs. Elles permettent ainsi la régulation de la survie, de l'autorenouvellement, de la migration et de la différenciation des CSHs. Les CSMs expriment l'angiopoïétine-1 (Ang-1), l'ostéopontine (OPN) et la thrompoïétine (TPO) qui retiennent les CSHs au sein des niches médullaires. En effet, les CSHs expriment les récepteurs de ces ligands. Les interactions Tie-2/Ang-1 permettent alors l'adhésion des CSHs et leur maintien dans un statut de quiescence par inhibition de la division cellulaire, arrêt le cycle en phase G0 et permettent ainsi la survie des CSHs (Arai *et coll.*, 2004). L'OPN inhibe également la prolifération des CSHs sans pour autant induire d'apoptose (Nilsson *et coll.*, 2005), tout comme les interactions TPO/c-Mpl qui régulent la quiescence des CSHs et leurs interactions avec la niche ostéoblastique (Yoshihara *et coll.*, 2007). De plus, les CSMs synthétisent et sécrètent un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines (CXCL12, SCF, Flt-3L, IL6, IL7, IL8, IL11, IL12, IL14 et IL15). Les complexes CXCL12/ CXCR4, VCAM-1/VLA-4, SCF/c-Kit et Flt3-L/Ft3 participent également au maintien des CSHs au niveau des niches médullaires. En effet, les CSHs expriment les récepteurs CXCR4 (Sugiyama *et coll.*, 2006), VLA-4 (Avecilla *et coll.*, 2004), c-Kit (Gu *et coll.*, 2003) et Flt3.

Toutes les molécules synthétisées par les CSMs (CXCL12, VCAM-1, SCF, Flt-3L, IL6, IL7, IL8, IL11, IL12, IL14 et IL15) sont également impliquées dans la différenciation et la maturation des différentes populations de cellules sanguines (Deans et Moseley, 2000). Les

CSMs jouent également un rôle dans la lymphopoïèse en participant à la maturation des lymphocytes B grâce à la sécrétion des facteurs SCF et IL7 (Milne *et coll.*, 2004).

3.3.2. Les CSMs et l'immunomodulation de la réponse lymphocytaire T

Les CSMs possèdent également des propriétés immunosuppressives qui pourraient être exploitées afin de favoriser l'implantation de greffes allogéniques. En effet, ces cellules ont la capacité d'inhiber la prolifération de lymphocytes T allogéniques en réponse à des cellules allogéniques ou des mitogènes (Rasmusson, 2006). Les CSMs ont également la capacité d'inhiber la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et des cellules dendritiques (CD) dans certaines conditions. De plus, les CSMs peuvent inhiber la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK, pour Natural –Killer. Tous les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire étant très complexes, ils ne seront pas développés ici [pour revue, Larghero *et coll.*, 2009].

3.3.3. Les CSMs et leurs implications tumorales

En plus de leur rôle dans la régénération des tissus lésés et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en conditions normales, il a été récemment décrit que les CSMs participaient à la progression tumorale. Les tumeurs solides sont composées de deux compartiments distincts mais dynamiquement reliés, le parenchyme, représentant le compartiment néoplasique au centre de la tumeur, et le stroma, incluant la matrice extracellulaire, les vaisseaux sanguins, les tissus connectifs et les CSMs (Li *et coll.*, 2007). La partie stromale fait la jonction entre les cellules cancéreuses et les tissus sains. Elle est également importante pour la progression tumorale. Il a également été montré que les tumeurs gliomateuses recrutent les CSMs en sécrétant un grand nombre de cytokines comme l'IL-8, le TGF- β et le VEGF (Birnbbaum *et coll.*, 2007). Une fois intégrées dans la périphérie de tumeurs épithéliales (cancer du sein), les CSMs participent à la régulation de la formation de métastases (Karnoub *et coll.*, 2007 ; Laird *et coll.*, 2008). Par ailleurs, les interactions entre les CSMs et des cellules de mélanomes stimulent la prolifération de ces dernières et la vascularisation des tumeurs en augmentant l'expression des récepteurs au VEGF (Sun *et coll.*, 2008). Ces études soulignent ainsi l'importance des interactions entre les CSMs et les cellules tumorales dans la progression tumorale. Néanmoins, le tropisme des CSMs pour les cellules tumorales pourrait en faire

d'excellentes candidates en terme de véhicule thérapeutique (Studený *et coll.*, 2004 ; Sato *et coll.*, 2005), si leur capacité de croissance tumorale était maîtrisée ou mieux, supprimée.

B. LES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE

1. VUE GENERALE SUR LES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE

Les éditeurs du journal « Cell Death and differentiation » ont créé en 2005 un comité de nomenclature des morts cellulaires, le NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death). Ce comité a développé une classification officielle des morts cellulaires basée sur des critères morphologiques de mort (apoptose, nécrose, autophagie, catastrophes mitotiques), des critères enzymatiques (avec ou sans augmentation de nucléases telles que les caspases ou les cathepsins), des aspects fonctionnels (mort programmée ou accidentelle, physiologique ou pathologique) et des caractéristiques immunologiques (immunogène ou non-immunogène) (tableau 1) [pour revue, voir Galluzzi 2007].

Mort cellulaire	Apoptose (Type I)	Autophagie (Type II)	Nécrose (Type III)	Catastrophes mitotiques
Aspects fonctionnels	Programmé, Physiologique et pathologique	Programmé, Physiologique	Brutal, Pathologique	Programmé, Physiologique et pathologique
Mode	Actif (ATP dépendante)	Actif	Passif	Actif (ATP dépendante)
Vitesse de déroulement	Rapide	Lent	Très rapide	Lent
Caractéristiques morphologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Arrondissement de la cellule • Rétraction des pseudopodes • Condensation du cytoplasme et de la chromatine • Fragmentation nucléaire • Légères modifications des organelles cytoplasmiques • Bourgeonnement de la membrane plasmique • Formation de corps apoptotiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de condensation de la chromatine • Formation de vacuoles autophagiques avec une double-membrane • Vacuolisation massive du cytoplasme et des organelles • Digestion à l'intérieur des vacuoles par les hydrolases lysosomales 	<ul style="list-style-type: none"> • Gonflement cytoplasmique • Gonflement des organelles cytoplasmiques • Condensation modérée de la chromatine • Rupture de la membrane plasmidique • Libération du contenu cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Micronucléation • Multinucléation
Critères enzymatiques	Caspases	Atg et cathepsines	non	
Immunogène	Non	Non	Oui, due au relargage du contenu intracellulaire	Non

Tableau 1 : Nomenclature des morts cellulaires (D'après Galluzzi 2007).

Les changements morphologiques définissent le mieux le type de mort subit par les cellules. L'apoptose, ou mort cellulaire de type I, provoque une condensation de la chromatine et une fragmentation nucléaire. Les cellules apoptotiques vont alors bourgeonner et former des corps apoptotiques contenant des organelles cytoplasmiques et des fragments nucléaires (Figure 11a). Les mécanismes de l'apoptose seront décrits dans le chapitre B.2.5 (Les mécanismes de l'apoptose).

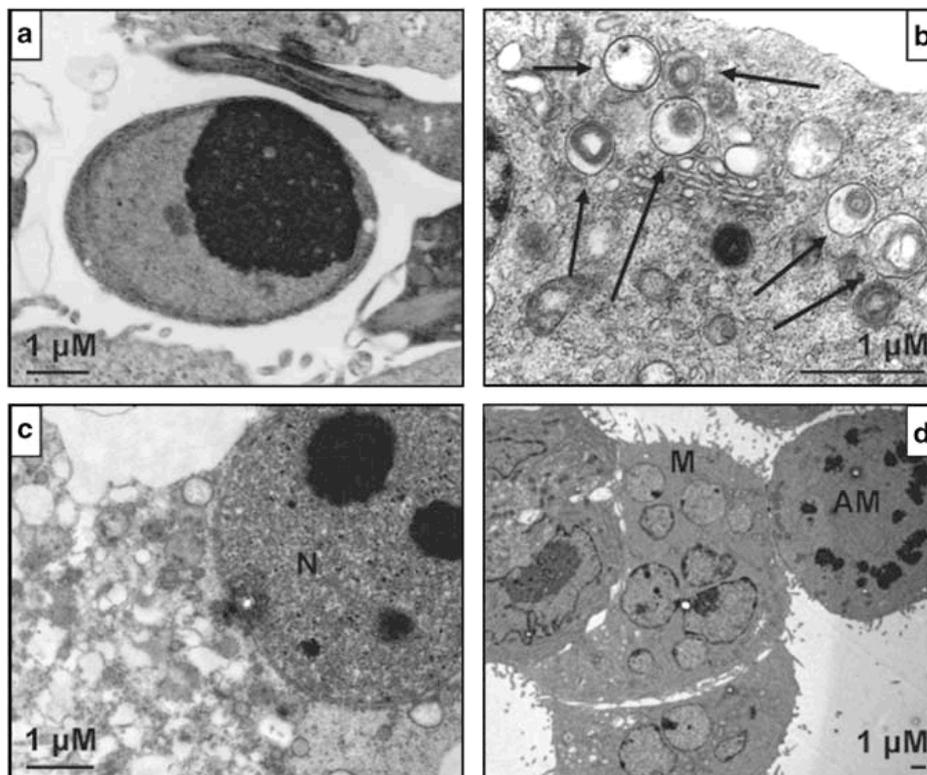


Figure 11 : Caractéristiques morphologiques des types de morts cellulaires (Galluzzi 2007).

(a) L'apoptose est caractérisé par le rétrécissement cellulaire et une condensation complète du noyau (pycnose). (b) L'autophagie est caractérisée par la présence de vacuoles cytoplasmiques possédant des doubles membranes (flèches). Ces vacuoles contiennent des organelles endommagées ou une partie du cytoplasme. (c) La nécrose est caractérisée par un noyau (N) est intact présentant de nombreux nucléoles alors que la membrane plasmatique et le cytoplasme sont endommagés. (d) Les cellules traitées avec des substances modifiant la dynamique des microtubules présentent les caractéristiques des catastrophes mitotiques, incluant des mitoses multipolaires aberrantes (AM) ainsi que des phénomènes de multinucléation (M).

Contrairement à l'apoptose qui est un mécanisme très rapide de dégradation des organelles et de l'ensemble du cytoplasme, l'autophagie est un processus lent. L'autophagie, ou mort cellulaire de type II, séquestre une partie du cytoplasme à l'intérieur de vacuoles à double membrane qui vont être digérées par les hydrolases lysosomales (Figure 11b). Les relations fonctionnelles entre l'apoptose et l'autophagie sont très complexes (développées dans le

chapitre B.4. de l'introduction, Interconnexions entre l'autophagie et l'apoptose). Cependant, l'autophagie peut également constituer un système cellulaire de défense contre des stress importants, comme une privation de nutriments ou de facteurs de croissance. Dans ce cas, l'autophagie est un mécanisme de survie. L'autophagie sera développée dans le chapitre 3 de l'introduction (Autophagie ou mort cellulaire de type II).

La nécrose, ou mort cellulaire de type III, est une mort accidentelle causée par des perturbations environnementales importantes. Elle est morphologiquement caractérisée par un gonflement du cytoplasme, une destruction des organelles et une rupture de la membrane plasmique. Ceci entraîne une lyse cellulaire totale et propagée au sein du tissu, provoquant ainsi une réaction inflammatoire (Figure 11c). Par opposition, plusieurs équipes décrivent l'apoptose comme n'affectant que des cellules isolées dans des tissus sains et prévenant une réponse inflammatoire *in vivo* (Hoffman, 2005). Toutefois, d'autres équipes montrent qu'une cellule en apoptose libère des facteurs provoquant l'apoptose des cellules environnantes. De plus, une inflammation locale régulée peut être observée au cours de l'apoptose par le relargage des interleukines IL-1 et IL-18 dans l'environnement.

Il existe un cas spécial de mort cellulaire, la catastrophe mitotique. Elle est observée lors d'un problème survenant au cours de la mitose. La catastrophe mitotique se traduit par une micronucléation et une multinucléation (Figure 11d). Elle résulte d'une combinaison de déficience des points de contrôle du cycle cellulaire (en particulier au niveau du contrôle de la structure de l'ADN et des fuseaux mitotiques) et de dommages cellulaires [pour revue, Castedo *et coll.*, 2004]. Par soucis de concision, ce type de mort cellulaire ne sera pas abordé dans ce mémoire.

2. L'APOPTOSE OU MORT CELLULAIRE DE TYPE I

2.1. Définition de l'apoptose

Le terme apoptose provient d'une locution grecque évoquant la « chute des feuilles » (*apo* pour éloignement et *ptosis* pour chute). L'apoptose est un mécanisme très conservé au sein de tous les organismes multicellulaires. Ce processus joue un rôle fondamental, dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et cellulaire, au cours du développement embryonnaire ainsi que tout au long de la vie. L'apoptose est la voie physiologique normale d'élimination des cellules

superflues, endommagées ou dysfonctionnelles. Elle survient en l'absence de toute maladie et fait partie intégrante du programme de développement cellulaire.

L'apoptose a été mise en évidence en 1972 lors de l'étude de tissus par microscopie électronique (Kerr *et coll.*, 1972). Ce mécanisme est également appelé mort programmée de type I. L'apoptose est une forme de mort cellulaire différente de la nécrose tant du point de vue morphologique que chimique (Kerr *et coll.*, 1972).

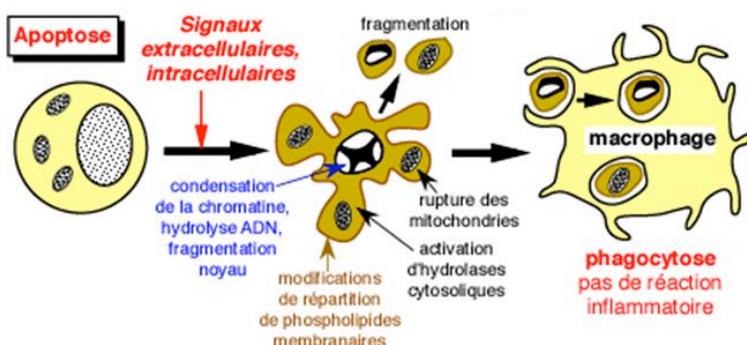


Figure 12 : Schéma de l'apoptose.

Au cours de l'apoptose, les cellules subissent de nombreuses modifications morphologiques. La membrane plasmique se désorganise et la cellule se détache des autres dans les tissus. La chromatine se condense en périphérie du noyau, l'ADN est hydrolysé et le noyau dégradé. La cellule se fragmente alors en corps apoptotiques qui sont rapidement phagocytés par les cellules voisines ou par des macrophages. L'élimination de toute trace d'apoptose prévient une réaction inflammatoire mais elle est également primordiale afin d'éviter toute nécrose secondaire qui aurait pour conséquence une libération aléatoire du contenu cellulaire (Figure 12).

2.2. Physiologie de la mort cellulaire

Au cours du développement, l'apoptose assure le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est à dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui constituent les tissus (Evan et Littlewood, 1998).

L'apoptose joue un rôle essentiel dans la sculpture des métamorphoses successives de notre corps (Strange *et coll.*, 2001). Elle forme la face interne et externe de l'embryon, la forme de nos bras et de nos jambes. L'apoptose est aussi impliquée dans la formation des doigts par mort cellulaire massive du tissu mésenchymateux intercostal (Zuzarte-Luís et Hurlé, 2002) ainsi que dans le développement des organes reproducteurs (Meier *et coll.*, 2000). L'apoptose

participe également à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes que sont notre cerveau (Flanagan, 1999 ; Verhage *et coll.*, 2000) et notre système immunitaire.

Néanmoins, la mort cellulaire ne se limite pas à la période embryonnaire, elle intervient tout au long de la vie d'un organisme. Les cellules d'un organisme subissent constamment cette mort cellulaire physiologique qui doit être coordonnée avec la prolifération cellulaire afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (Vaux et Korsmeyer, 1999).

L'apoptose participe au développement, la différenciation, la prolifération, l'homéostasie, la régulation et le fonctionnement du système immunitaire, ainsi que l'élimination des cellules défectueuses et potentiellement dangereuses. C'est pourquoi tout dysfonctionnement ou dérégulation du programme apoptotique conduit à de nombreuses variétés de pathologies. Des défauts d'apoptose peuvent conduire à des cancers, des maladies auto-immunes et des infections virales (Sorenson et Sheibani, 2002 ; Droin et Green, 2004). A l'inverse, les maladies neurodégénératives, le SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis) ou les ischémies sont causées ou favorisées par une apoptose excessive (Fadeel *et coll.*, 1999).

2.3. Les protéines de la famille de Bcl-2

Les acteurs principaux de l'apoptose sont les membres de la famille de Bcl-2 et les caspases.

2.3.1. Présentation des membres de la famille de Bcl-2

2.3.1.1. Les protéines anti-apoptotiques

Les membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-X_L (ou Bcl-2 L1 pour BCL-2 related X protein Long isoform 1), Bcl-w (ou Bcl-2 L2), Bcl-B (ou Bcl-2 L10), A1/Bfl-1, Boo/Diva et Mcl-1 (Myeloid Cell Leukaemia-1) possèdent quatre domaines d'homologie BH nommés BH1, BH2, BH3 et BH4 (Figure 13a). Cependant, même si Mcl-1 présente une structure similaire à Bcl-2, elle ne possède pas de domaine BH4 classique (Michels *et coll.*, 2005).

Ces protéines anti-apoptotiques forment ainsi un hétérodimère protecteur en séquestrant le domaine BH3 des membres pro-apoptotiques dans leur poche hydrophobique. Cette dernière est constituée des domaines BH1, BH2 et BH3 des protéines anti-apoptotiques. Le domaine BH4 stabilise la poche hydrophobique de ces protéines. Elles inhibent alors le processus apoptotique.

2.3.1.2. Les protéines pro-apoptotiques à multidomaines

Les membres pro-apoptotiques à multidomaines possèdent trois domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3 (Figure 13b). Ce groupe comprend Bax (Bcl-2 Associated X protein), Bak (Bcl-2 Antagonist Killer), Bok/Mtd (Bcl-2-related Ovarian Killer/ Matador) et Bcl-X_s (BCL-2 related X protein Short isoform). Les protéines Bax et Bak sont cruciales pour l'induction de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe ou MME. L'activation de Bax et Bak aboutit à un changement conformationnel de ces protéines. Ces protéines vont alors s'oligomériser dans la MME [pour revue, Lalier *et coll.*, 2007]. Ceci précède la libération des molécules apoptogéniques mitochondriales permettant l'activation des Caspases. Les cellules perdent toute capacité à induire l'apoptose par la voie mitochondriale lorsqu'elles sont déficientes en Bax et Bak (Wei *et coll.*, 2001).

2.3.1.3. Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-seul

Les membres de la famille de Bcl-2 ne comportant qu'un seul domaine BH3 sont également nommés BOP (BH3-only proteins), tels que Bik (Bcl-2-Interacting killer), Bid (BH3 Interacting Death agonist), Bad (Bcl-2 Antagonist of cell Death), Bim/Bod (Bcl-2-Interacting Mediator of cell death), Puma/BBC3 (Bcl-2 Binding Component 3), Noxa, Spike (Mund *et coll.*, 2003), BNIP3 (Bcl-2 nineteen-kilodalton interacting protein) et BNIP3L (BNIP3 isoform Long), pour ne citer que ceux-là.

Les BOP sont des initiateurs du processus apoptotique. Cependant, ces protéines ne peuvent pas former d'homodimères et ne possèdent pas d'activité intrinsèque. En fait, ces protéines favorisent la constitution de dimères pro-apoptotiques (Kelekar *et coll.*, 1997 ; Sattler *et coll.*, 1997) comme Bid et Bim se liant à Bax et Bak (Kuwana *et coll.*, 2005 ; Kim *et coll.*, 2006 ; Certo *et coll.*, 2006). La protéine Bid est régulée par clivage, soit par la Caspase-8 (Li *et coll.*, 1998), le granzyme B (Barry *et coll.*, 2000) ou la Calpaïne (Chen *et coll.*, 2001). La protéine Bid peut être clivée par la Caspase-8 à la suite de l'action du TNF α ou d'un traitement par le ligand Fas (développé dans le chapitre B.2.5.1 de l'introduction, Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort). Dans ce cas, Bid est clivé au niveau de son domaine N-terminal et génère ainsi tBid, une partie tronquée de 15 kDa appelée p15-tBid. Le granzyme B peut également cliver Bid au niveau de ce même domaine et générer alors une protéine p13-tBid (Barry *et coll.*, 2000 ; Sutton *et coll.*, 2000 ; Wang *et coll.*, 2001). Ces fragments de Bid sont capables

de transloquer à la mitochondrie où ils induisent l'apoptose en activant les propriétés pro-apoptotiques de Bax ou Bak (Desagher *et coll.*, 1999 ; Eskes *et coll.*, 2000). Le fragment p15-tBid interagit préférentiellement avec Bak tandis que le fragment p13-tBid interagit préférentiellement avec Bax (Cartron *et coll.*, 2003).

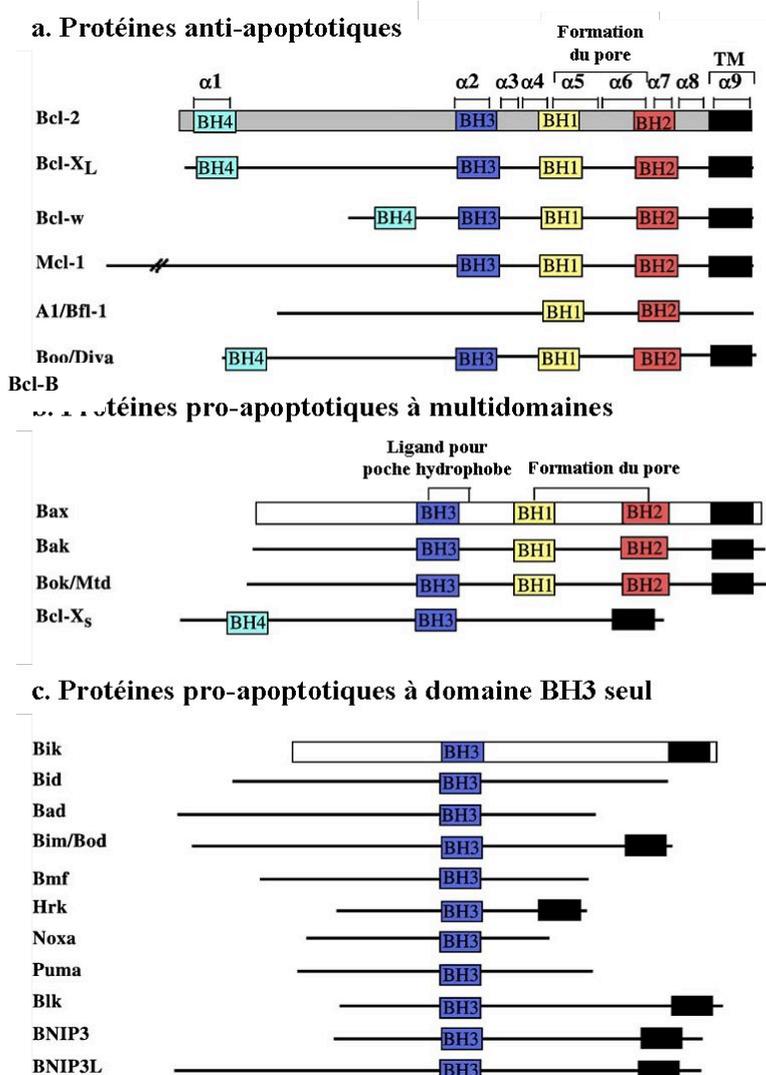


Figure 13 : Classification des membres de la famille de Bcl-2 (D'après Er *et coll.*, 2006).

Dans le même temps, les protéines à domaine BH3-seul jouent leur rôle pro-apoptotique en formant des dimères avec des membres anti-apoptotiques réduisant ainsi la capacité de ceux-ci à former des homodimères protecteurs (Letai *et coll.*, 2002). Par exemple, Bad exerce sa fonction pro-apoptotique par hétérodimérisation avec un membre anti-apoptotique (Zha *et coll.*, 1997).

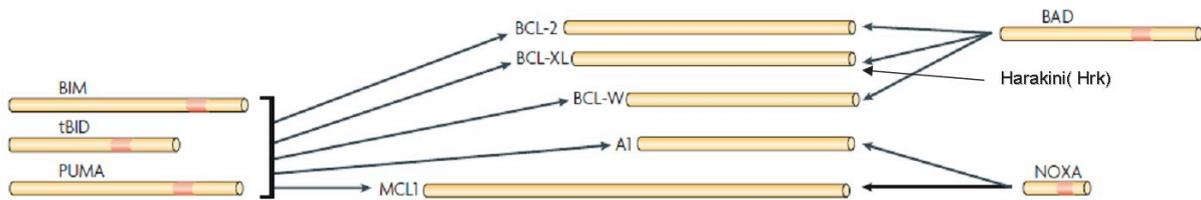


Figure 14 : Liaisons spécifiques des protéines BH3-seul pour les homologues de Bcl-2 (D'après Youle et Strasser 2008).

Les partenaires de ces BOP ont été déterminé par double-hybride, « plasmon resonance binding assays », « by cell-free mitochondria » et des études de perméabilisation de liposomes (Letai *et coll.*, 2002 ; Chen *et coll.*, 2005 ; Kuwana *et coll.*, 2005 ; Kim *et coll.*, 2006 ; Certo *et coll.*, 2006 ; Willis *et coll.*, 2005). Les résultats obtenus indiquent que les protéines activées Bim, Puma et tBid se fixent à l'ensemble des protéines anti-apoptotiques. D'autres sont plus spécifiques, comme Noxa qui inhibe A1/Bfl-1 et Mcl-1, et Bad qui inhibe Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-W (Figure 14).

2.3.2. Structure primaire des membres de la famille de Bcl-2

2.3.2.1. Le domaine BH3

Le domaine BH3 est commun à l'ensemble des protéines de la famille de Bcl-2. De plus, il est le seul domaine conservé des protéines pro-apoptotiques à BH3-seul.

Le domaine BH3 joue un rôle clé dans le déclenchement de l'apoptose. Cette idée est renforcée par le fait que les protéines à domaine BH3-seul présentent une fonction pro-apoptotique car elles sont dépourvues de domaines BH1 et BH2. De plus, le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques comme Bax ou Bak est suffisant pour promouvoir l'apoptose et leur liaison à Bcl-2 ou Bcl-xL (Chittenden *et coll.*, 1995 ; Kim *et coll.*, 2004). En effet, l'introduction du domaine BH3 de Bax dans Bcl-2 suffit à convertir Bcl-2 en protéine pro-apoptotique (Hunter et Parslow, 1996).

Des études de mutagenèse montrent également que l'activité pro-apoptotique du domaine BH3 s'exerce par hétérodimérisation avec les protéines anti- ou pro-apoptotiques (Wang *et coll.*, 1996). Par exemple, le domaine BH3 de Bid est nécessaire à son association avec les domaines BH1 de Bcl-2 ou de Bax (Wang *et coll.*, 1996).

2.3.2.2. Les domaines BH1 et BH2

Les domaines BH1 et BH2 des protéines anti-apoptotiques sont nécessaires pour leur fonction d'inhibition de l'apoptose et pour leur hétérodimérisation avec la protéine pro-apoptotique Bax (Borner *et coll.*, 1994 ; Yin *et coll.*, 1994). Cependant, l'importance des domaines BH1 et BH2 diffèrent selon le rôle anti-ou pro-apoptotique de la protéine. En effet, des mutations ou des délétions dans les domaines BH1 et BH2 de Bax n'empêchent ni la liaison de Bax à Bcl-2 ou Bcl-xL, ni l'inhibition de l'effet protecteur de Bcl-xL (Simonian *et coll.*, 1996a ; Simonian *et coll.*, 1996b). De même, la délétion des domaines BH1 et BH2 de Bak n'inactive pas cette protéine (Chittenden *et coll.*, 1995).

2.3.2.3. Le domaine BH4

Le domaine BH4 est le moins conservé de tous les domaines BH. Il est présent dans la plupart des membres anti-apoptotiques. Cependant, il est retrouvé de façon exceptionnelle dans la protéine pro-apoptotique Bcl-Xs. Ce domaine apparaît être essentiel à la fonction anti-apoptotique des protéines possédant ce domaine BH4. En effet, des mutations dans ce domaine font perdre la fonction pro-survie des protéines anti-apoptotiques et convertissent celles-ci en membres pro-apoptotiques (Cheng *et coll.*, 1997).

2.3.2.4. Le domaine transmembranaire C-terminal

La plupart des membres de la famille de Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire en C-terminal. Ce domaine leur permet d'avoir une localisation au niveau de la membrane mitochondriale externe, du réticulum endoplasmique ou de la membrane nucléaire externe (Nguyen *et coll.*, 1993 ; Akao *et coll.*, 1994 ; Hsu *et coll.*, 1997).

2.3.3. Bcl-2 et Bcl-xL : protéines pro-apoptotiques?

2.3.3.1. Clivage de Bcl-2

Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique. Cependant, des modifications post-traductionnelles de ces protéines inactivent leur fonction anti-apoptotique. Par exemple, l'équipe de Hardwick montre que Bcl-2 est convertie en protéine effectrice de mort de type Bax par un clivage par les Caspases (Cheng *et coll.*, 1997). D'autres études rapportent également le clivage caspase-

dépendant de Bcl-2 et Bcl-xL. Ce clivage a lieu en réponse à différents stimuli apoptotiques comme le retrait de facteurs de croissance, la liaison de Fas sur son récepteur, le cisplatine ou l'étoposide (Grandgirard *et coll.*, 1998 ; Clem *et coll.*, 1998 ; Fujita *et coll.*, 1998 ; Fujita et Tsuruo, 1998 ; Fadeel *et coll.*, 1999 ; Del Bello *et coll.*, 2001). Le clivage de Bcl-2 par les caspases se situe au niveau de la boucle flexible, conduisant ainsi à la perte de son domaine BH4 et l'exposition du domaine BH3. La molécule anti-apoptotique est alors convertie en un fragment pro-apoptotique qui accélère la mort cellulaire (Cheng *et coll.*, 1997 ; Fujita et Tsuruo, 1998). Le traitement des cellules par des agents chimiothérapeutiques causant des dommages à l'ADN semble induire un clivage préférentiel de Bcl-2 (Fujita et Tsuruo, 1998 ; Fadeel *et coll.*, 1999).

2.3.3.2. Phosphorylation de Bcl-2

Bcl-2 est soumise à une régulation par phosphorylation au niveau de résidus spécifiques situés dans la boucle flexible. En effet, Bcl-2 est phosphorylée en réponse à plusieurs stimuli comme un traitement avec un agent de chimiothérapie comme le Taxol[®] ou avec des agents agissant sur le cytosquelette. Ces produits induisent l'activation de la kinase JNK qui phosphoryle Bcl-2 au niveau des résidus T56, S70, T74 et S87 [pour revue, Blagosklonny, 2001]. L'addition de facteurs de survie (Poommipanit *et coll.*, 1999) et l'activation de protéine kinase C (Ruvolo *et coll.*, 1998) induisent aussi une phosphorylation de Bcl-2 (Blagosklonny *et coll.*, 1997 ; Haldar *et coll.*, 1997). Dans la plupart des cas, la phosphorylation de Bcl-2 l'empêche d'interférer avec les domaines BH3 de Bax (Haldar *et coll.*, 1995 ; Cheng *et coll.*, 1997) ou de Beclin 1 (Wei *et coll.*, 2008). Néanmoins, dans d'autres systèmes cellulaires, la phosphorylation de Bcl-2 augmente son activité (Deng *et coll.*, 1998 ; Breitschopf *et coll.*, 2000).

2.3.3.3. Interactions Bcl-2/Nur77

Le phénotype de Bcl-2 peut également être inversé par liaison avec un membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, Nur77/TR3 ou NR4A1 (Nuclear Receptor 4A1) (Lin *et coll.*, 2004). Nur77 est un facteur nucléaire induisant la transcription de gènes de survie en conditions normales [pour revue, voir Moll *et coll.*, 2006] (Figure 15).

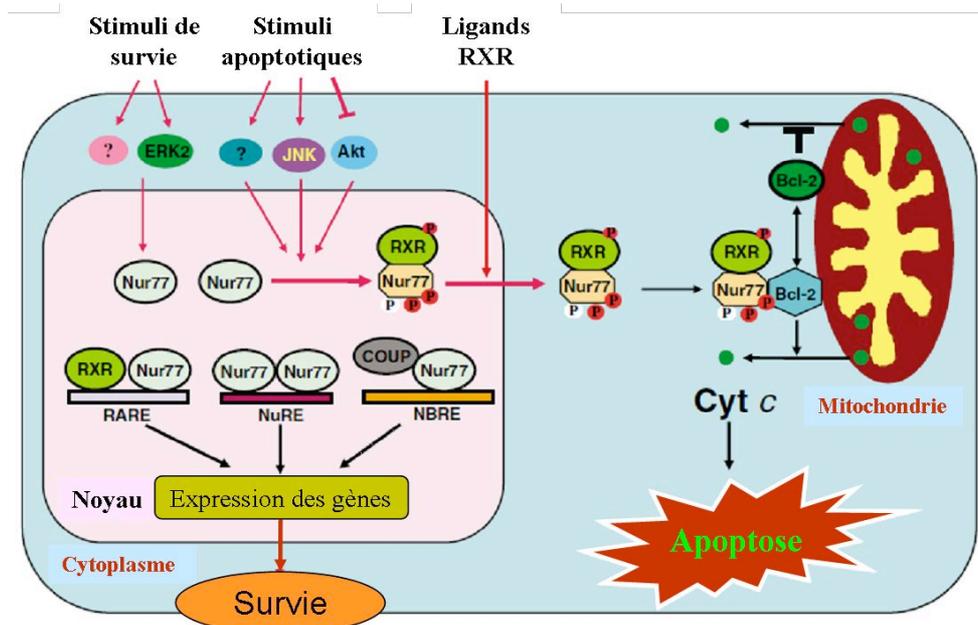


Figure 15 : Les voies de signalisation de Nur77, survie ou apoptose (D'après Moll 2006)

A l'inverse, des stimuli apoptotiques provoquent la phosphorylation de Nur77 (Figure 15), ce qui cause la translocation et l'accumulation de ce facteur de transcription dans le cytosol (Li *et coll.*, 2000 ; Han *et coll.*, 2006). En effet, Nur77 peut être phosphorylé sur le résidu S351 par Akt (Masuyama *et coll.*, 2001), sur son domaine N-terminal par les kinases JNK (Kolluri *et coll.*, 2003), ERK2 (Slagsvold *et coll.*, 2002) et les MAPKs (Katagiri *et coll.*, 2000).

Une fois phosphorylé, Nur77 se lie sur la boucle de Bcl-2 (Kolluri *et coll.*, 2008) au niveau de la membrane mitochondriale (Lin *et coll.*, 2004). Cette interaction induit un changement conformationnel de Bcl-2 avec l'exposition de son domaine BH3 (Figure 16). Bcl-2 mime ainsi l'action des membres pro-apoptotiques BH3-seul de la famille de Bcl-2. En effet, Bcl-2 se dimérise avec les membres anti-apoptotiques *via* son domaine BH3 pour contrecarrer les actions de ces membres de la famille de Bcl-2 (Lin *et coll.*, 2004). De plus, ce changement de conformation lève l'inhibition de Bcl-2 sur les membres pro-apoptotiques.

Récemment, l'équipe de Reed a décrit que Nur77 interagit sélectivement avec Bcl-2, Bfl-1 et Bcl-B, mais pas avec Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-W. Nur77 convertit alors les phénotypes protecteurs de Bfl-1 et Bcl-B en protéines pro-apoptotiques, avec le même mécanisme décrit précédemment pour Bcl-2 (Luciano *et coll.*, 2007).

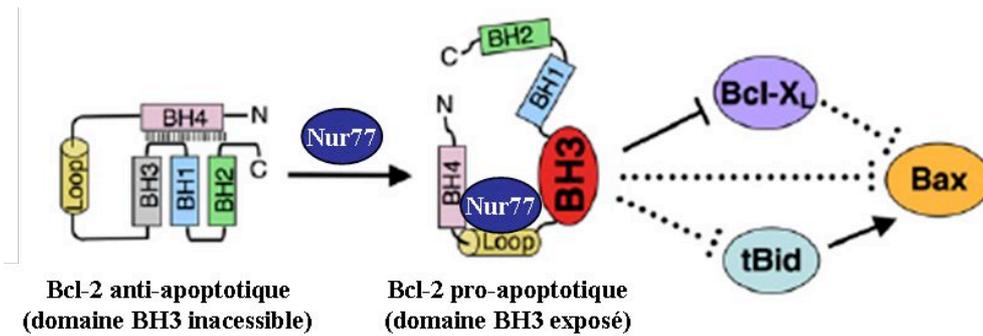


Figure 16 : Modèle de conversion de Bcl-2 par Nur77 (D'après Kolluri 2008)

Cependant, la protéine Notch peut antagoniser le rôle pro-apoptotique de Nur77. En effet, le domaine intracellulaire de Notch, ou NICD, est riche en domaine ankyrin, ce qui permet son association avec Nur77 et l'inhibition de ce dernier. Néanmoins, le domaine NICD est clivé par les caspases-3 et -6 au cours de l'apoptose des cellules Jurkat. Ces clivages empêchent alors l'association NICD/Nur77 et dans ce cas, Nur77 devient pro-apoptotique (Cohen *et coll.*, 2005).

2.4. Les Caspases

L'importance des Caspases dans l'apoptose a été mise en évidence par l'identification et le clonage du gène pro-apoptotique *ced-3* chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Ellis *et coll.*, 1991).

2.4.1. Nomenclature

Les caspases sont des protéases apoptogènes. Cette nomenclature a été proposée par l'équipe de Yuan. Elle regroupe les protéases apoptogènes sous le nom de Caspase. Le **C** représente la cystéine du centre actif (QAC**C**xG) et **aspase** définit la spécificité stricte de clivage après un acide **aspartique** des substrats de cette famille de protéase. Cette spécificité de clivage n'est partagée qu'avec une seule autre protéase, le Granzyme B (une sérine protéase présente dans les lymphocytes T cytotoxiques).

L'homologue humain de *ced-3* est la protéine ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme). Etant la première Caspase caractérisée chez les mammifères (Cerretti *et coll.*, 1992 ; Thornberry *et coll.*, 1992), elle a été rebaptisée tout naturellement Caspase-1 (Alnemri *et coll.*, 1996).

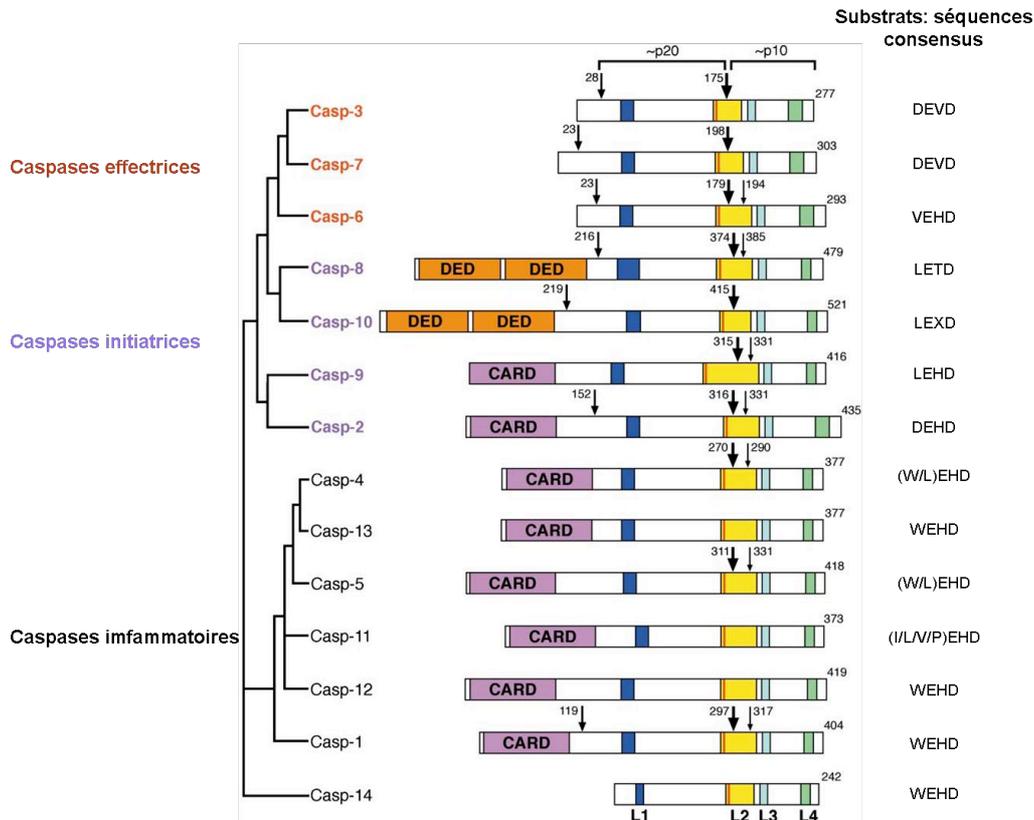


Figure 17 : Diagramme phylogénétique des Caspases (tiré de (Shi, 2002))

La position du premier site de clivage est indiquée par la flèche épaisse, les autres sites de clivage étant représentés par des flèches plus fines. Le sillon catalytique des Caspases est représenté par les quatre boucles L1 à L4. Le résidu Cys catalytique est représenté par un trait rouge au début de la boucle L2. La séquence consensus de chaque Caspase est indiquée sur la droite.

À l'heure actuelle, 14 Caspases ont été identifiées mais cette liste n'est pas exhaustive ; à l'exception des Caspases-11 (souris, homologue de la Caspase-4 humaine) et -13 (bovine), elles existent toutes chez l'Homme. Par la suite, l'analyse fonctionnelle des quatorze membres de cette famille a permis de distinguer trois classes de protéines : les Caspases effectrices (Caspases-3, -6 et -7), les Caspases initiatrices (Caspases-2, -8, -9, -10 et -12) de l'apoptose et les Caspases inflammatoires (Caspases-1, -4, -5, -11, -12 et -14) impliquées dans le processus de maturation des cytokines (Figure 17).

2.4.2. Structure

Les Caspases sont exprimées de façon constitutive dans la cellule et résident dans le cytosol sous forme d'apoenzymes catalytiquement inactives ou zymogènes (de 30 à 50 kDa). Toutes ces protéases à cystéine possèdent une structure très conservée comprenant 3 domaines : un

prodomaine N-terminal de taille variable, une grande sous-unité (17-21 kDa) qui porte le site actif de la Caspase et une petite sous-unité (10-14 kDa) qui détermine la spécificité de l'enzyme pour ses substrats. Les grandes et petites sous-unités sont obtenues après clivage de l'apoenzyme. Certains membres de la famille des Caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité.

Les prodomaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence. Ainsi, les Caspases à grands prodomaines (> 100 acides aminés) sont souvent regroupées sous le nom de Caspases initiateuses (Caspases -2, -8, -9 et -10) et de Caspases inflammatoires (Caspases -1, -4, -5, -11, -12 et -13). L'activation des Caspases initiateuses se situe en amont de la cascade de signalisation et ne participe pas directement à l'apparition des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Cependant, les Caspases initiateuses activent les Caspases à petits prodomaines (< 30 acides aminés). Ces Caspases sont dites effectrices (Caspases -3, -6 et -7) et sont importantes dans le processus apoptotique (Nicholson, 1999).

Les prodomaines sont impliqués dans les interactions protéines-protéines. Ainsi les prodomaines des Caspases-8 et -10 contiennent des domaines effecteurs de mort cellulaire **DED** (Death Effector Domain) qui sont des structures permettant la liaison de la Caspase aux molécules adaptatrices FADD ou TRADD (discuté en 2. 5. 1). D'autres Caspases (Caspases -1, -2, -4 et -9) possèdent un domaine de recrutement des Caspases **CARD** (Caspase Recruitment Domain). Ces domaines CARD jouent un rôle dans l'interaction entre Caspases mais aussi avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices possédant ce domaine (Hofmann *et coll.*, 1997).

Le site actif des Caspases présente des caractéristiques conservées. Le site catalytique de ces enzymes comprend un résidu cystéine localisé au centre du motif QACxG (où x = R, Q ou G). Le sillon de liaison du substrat est façonné par quatre boucles périphériques nommés L1, L2, L3 et L4 (Shi, 2002).

2.4.3. Activation des Caspases

Les Caspases sont présentes dans le cytoplasme sous une forme de zymogène. Comme elles clivent spécifiquement leurs substrats au niveau d'un résidu Asp, elles peuvent s'autoactiver et/ou s'activer mutuellement, ce qui aboutit à une cascade protéolytique. La dimérisation des

formes zymogènes conduit à leur clivage. Un premier clivage libère la petite sous-unité, tandis qu'un second clivage libère le prodomaine de la grande sous-unité portant le site catalytique. L'enzyme formée par l'association des deux sous-unités est composée de deux hétérodimères qui comprennent chacun deux sites catalytiques actifs, formant alors un hétérotétramère (Budihardjo *et coll.*, 1999) (Figure 18). D'après la structure tridimensionnelle des Caspases, cette réorganisation expose deux sites actifs pour catalyser la réaction.

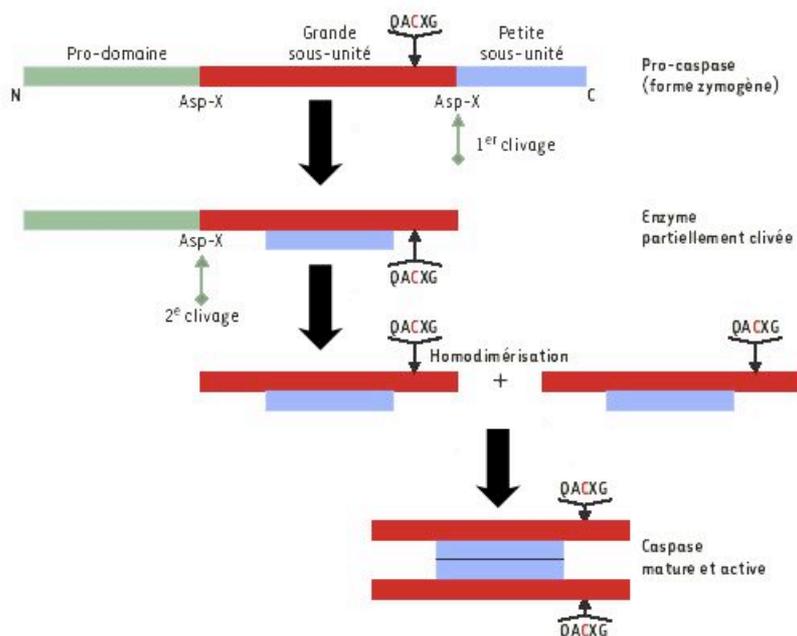


Figure 18 : Activation en cascade des Caspases.

La majorité des études sur l'apoptose repose sur le fait que les précurseurs des Caspases sont activés par clivage. Bien que ce soit le cas pour les Caspases effectrices, de nombreuses études tendent vers un nouveau mécanisme d'activation des Caspases initiatrices. Il s'agirait d'une dimérisation induite par le rapprochement des Procaspases, sans clivage nécessaire, appelé « modèle de proximité ». En effet, de nombreuses études ont révélé que le clivage n'est ni nécessaire, ni suffisant à l'activation des Caspases initiatrices (Stennicke *et coll.*, 1999 ; Srinivasula *et coll.*, 1998 ; Srinivasula *et coll.*, 2001 ; Srinivasula *et coll.*, 2002 ; Martinon *et coll.*, 2002 ; Chang *et coll.*, 2003).

Les proformes des Caspases initiatrices existent dans la cellule sous forme de monomères inactifs. Leur dimérisation est nécessaire à l'obtention de la conformation active de la Caspase (Figure 19). L'activation des Caspases initiatrices et inflammatoires réside donc dans le rapprochement des monomères inactifs afin de former un dimère contenant un seul site actif

(Figure 19a). L'auto-clivage qui en résulte ne semble être qu'un événement de stabilisation de ce dimère (Boatright et Salvesen, 2003). Le phénomène primordial est l'oligomérisation au sein de complexes multiprotéiques *via* des interactions homotypiques avec des protéines adaptatrices. Contrairement aux Caspases initiatrices et inflammatoires, les Caspases effectrices existent dans le cytosol sous forme de dimères préformés inactifs (Boatright et Salvesen, 2003 ; Shi, 2002) et sont activées par protéolyse par une Caspase initiatrice ou par une autre protéase (Figure 19b).

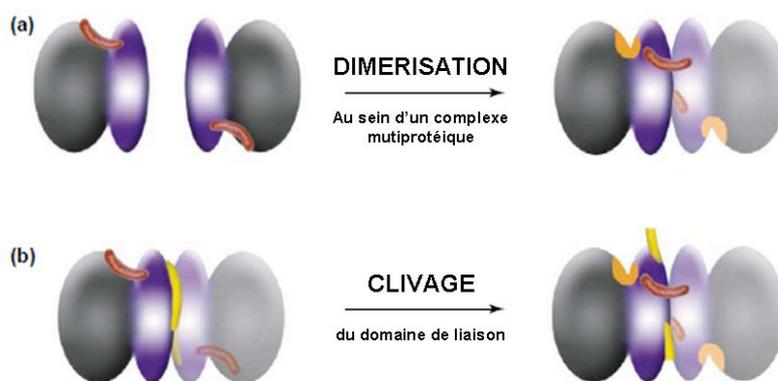


Figure 19 : Représentation schématique des deux mécanismes d'activation des Procaspases (D'après Boatright et Salvesen, 2003).

(a) Activation des Caspases initiatrices. Les zymogènes de ces Caspases sont sous forme de monomères inactifs et sont activés par dimérisation, permettant la translocation de la boucle d'activation (« saucisse » rouge) dans la poche acceptative du dimère voisin. Les sites actifs sont représentés en orange. **(b) Activation des Caspases exécutrices.** Les zymogènes de ces Caspases existent sous forme de dimères préformés et sont maintenus dans une conformation inactive par des encombrements stériques imposés par leur domaine de liaison (représenté par une « banane » jaune). Le clivage du domaine de liaison permet la translocation de la boucle d'activation, facilitant la formation du site actif. Notons que les processus d'activation et de translocation de la boucle d'activation sont conservés aussi bien pour les Caspases initiatrices qu'exécutrices.

La Caspase-3 peut également être clivée par des protéases dépendantes du Ca^{2+} comme la Calpaïne (Figure 20). Dans ce cas, un clivage en N-terminal de la Caspase-3 élimine le prodomaine de cette enzyme et donne une forme de 29 kDa. Elle subit un autre clivage dépendant du Ca^{2+} pour former un fragment de 25 kDa. L'activité de cette Caspase est plus faible que celle détectée au cours de l'apoptose. En effet, ce clivage rend la Caspase-3 non activable par les Caspases initiatrices -8 et -9, il y a donc pas formation de tétramères fonctionnels pour le processus apoptotique (Pelletier *et coll.*, 2005).

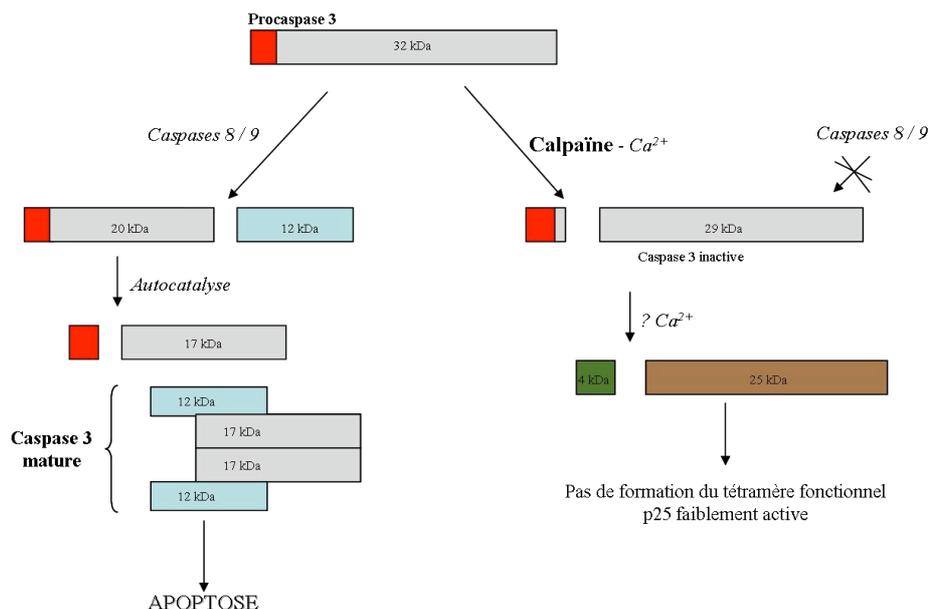


Figure 20 : Clivage de la Caspase-3

2.4.4. Substrats des Caspases

Les cibles des Caspases sont des protéines dont la dégradation aboutit soit à la perte de leur fonction, soit à l'acquisition de nouvelles activités enzymatiques. Le premier substrat identifié est l'enzyme poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) dont la coupure, au niveau de la séquence DEVD-G, est l'un des premiers signes détectables de l'apoptose. A l'heure actuelle, la liste des protéines clivées *in vivo* et *in vitro* par les Caspases est toujours en constante augmentation (> 200). Les études réalisées décrivent les Caspases comme clivant des régulateurs clés des composants structuraux du cytosquelette et du noyau, tout comme de nombreuses protéines impliquées dans différentes voies de signalisation (Earnshaw *et coll.*, 1999 ; Nicholson, 1999 ; Denault et Salvesen, 2002 ; Fischer *et coll.*, 2003) :

- Régulation de l'apoptose (Apaf-1, Bad, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Bid, c-FLIP, c-IAP1, Procaspases, XIAP) : leur clivage par les Caspases les rendent pro-apoptotiques
- Cytosquelette et protéines structurales (Actine, Filamine, α -Fodrine : nonérythroïde spectrine, Gelsoline, Kératines, protéines de jonction, β -caténine, placoglobine, rabaptine-5 : protéine de fusion endosomale, Spectrines, Serpin : plasminogen activator inhibitor-2, Tau, Troponine T, Tubuline, Vimentine...),
- Adhésion cellulaire (APC, CALM, β - et γ -caténines, Desmoplakin, les cadhérines, FAK, HEF1, Paxillin, Plakophilin-1...)

- Protéines nucléaires (lamine-A/B ; récepteur à la lamine B, les nucléoporines, les protéines se liant à l'ARN, les protéines associées aux ribonucléoprotéines, chromosome scaffold binding protein...)
- Protéines du réticulum endoplasmique et du Golgi (p28BAP31, Golgin-160, Kinectin)
- Les protéines kinases (PKC et ses isoformes ; MAPK, ERK, Akt, Wee1...)
- Les cytokines (pro-interleukin cytokines, phospholipases...)
- Cycle cellulaire (c-abl, les cdc-6/27, les cyclines A/E, MDM2, MDMX, NuMA : nuclear mitotic apparatus protein, p21^{Waf1}, p27^{KIP1}, Rb, Wee1...)
- Régulation du cycle cellulaire (p21, p27, pRB, Wee1...)
- Synthèse, clivage et réparation de l'ADN (Acinus, ATM, BLM, DNA-PKs, protéines de réplication de l'ADN, les PARPs, Topoisomérases de l'ADN, XRCC4, ARN-polymerase...)
- Facteurs de transcription et de liaison à l'ADN (AP-2 α , CREB, GATA-1, HSF, I κ B α , NF- κ B, Sp1, STAT1, ...)
- Synthèse et épissage de l'ARN (BTF3, hnRNPs, Nucleolin, SRPKs, ...)
- Traduction des protéines (60S, DAP5, eIF2 α /3/4B, NAC, PABP4, SRP72, ...)
- Les récepteurs membranaires (EGFR, ErbB-2, RET, TCR, TNFR, ...)
- Les phosphatases (Calcineurin, PP2A...)
- Et bien d'autres comme la voie de la protéine G, les métabolismes du Calcium, c-AMP, c-GMP et des lipides...

Une base de donnée regroupant l'ensemble des substrats des caspases a été réalisée par Alexander Lüthi et le laboratoire Martin, The CASBAH pour The CASpase Substrate dataBase Homepage (Lüthi et Martin, 2007).

Lorsqu'elles sont activées au cours de l'apoptose, les Caspases vont éteindre les voies protectrices et activer les molécules participant à la destruction cellulaire. Elles vont alors générer un arrêt du cycle cellulaire, une mise hors service des mécanismes de réparation, un désassemblage des structures moléculaires et une préparation à la dégradation par phagocytose.

Cependant, les Caspases sont également impliquées dans la transduction du signal, l'expression des gènes, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, les maladies génétiques, la neurodégénérescence [pour revue, Fischer *et coll.*, 2003 ; Timmer et Salvesen, 2007 ; Chowdhury *et coll.*, 2008].

2.4.5. Régulation des Caspases

Dans les cellules saines, l'expression, l'activation et l'inactivation des Caspases sont contrôlées par différents mécanismes activateurs ou inhibiteurs. Chez les mammifères, la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des procaspases varient selon le type cellulaire. Par soucis de concision, je ne développerai pas ces points. A l'inverse, je développerai la régulation de l'activité des Caspases. L'action de ces protéines est régulée à différents niveaux, incluant le blocage de leur activation au niveau du DISC (Death-Inducing Signal Complex) et l'inhibition de leur activité enzymatique. Il existe deux grands types de régulateur des Caspases : les IAPs (Inhibitor of Apoptosis proteins) et la protéine FLIP (FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme) -like inhibitory protein).

2.4.5.1. Les IAPs ou Inhibitors of Apoptosis Protein

Les membres de la famille des IAPs sont des protéines synthétisées par le baculovirus (Roy *et coll.*, 1997). Huit analogues ont été identifiés chez les mammifères dont six chez l'humain : NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein), c-IAP1/HIAP-2, c-IAP2/ HIAP-1, XIAP/hILP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), la Survivine et BRUCE (Deveraux et Reed, 1999). Les IAPs sont caractérisés par la présence d'un, deux ou trois domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat) en N-terminal (Birnbaum *et coll.*, 1994) essentiels pour leur propriété anti-apoptotique (Ducket 1998). Ces structures se lient à la surface des Caspases et/ou bloquent le site catalytique des Caspases.

La voie mitochondriale est régulée par l'interaction du domaine BIR3 des IAPs (principalement XIAP, c-IAP1 et c-IAP2) avec la Procaspase-9 (Johnson et Jarvis, 2004) tandis que les domaines BIR1 et BIR2 ciblent les Caspases-3 et -7. Cependant les IAPs sont incapables d'interagir et d'inhiber la Caspase-8. Néanmoins elles inhibent son substrat, la Caspase-3, ce qui arrête la cascade protéolytique induite par voie extracellulaire (Deveraux *et coll.*, 1998 ; Deveraux *et coll.*, 1999). Par exemple, XIAP séquestre les Caspases dans un état monomérique inactif et s'oppose ainsi à leur auto-activation (Deveraux et Reed, 1999 ; Shiozaki *et coll.*, 2003).

Cependant toutes les protéines IAPs ne sont pas des inhibiteurs des Caspases ou de l'apoptose. Par exemple, la survivine, ne contenant qu'un domaine BIR, régule la mitose plutôt que l'apoptose

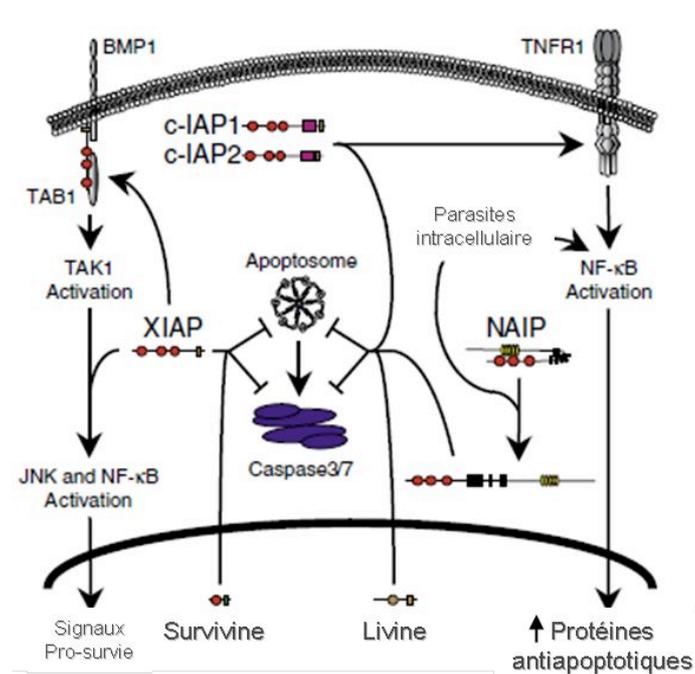


Figure 21 : Résumé de l'activité des IAPs (d'après Liston *et coll.*, 2003).

En plus des mécanismes d'inhibition directe des Caspases, les IAPs possèdent des fonctions leur permettant d'inhiber les Caspases en agissant comme des ubiquitines ligases E3, conduisant à leur destruction rapide par le protéasome. En effet, certaines de ces protéines (notamment XIAP, c-IAP1 et c-IAP2) possèdent également un domaine RING dans leur partie C-terminale. Le domaine RING est une structure dite « en doigt de zinc » qui est un trait caractéristique des ubiquitines ligases E3 [pour revue, Joazeiro et Weissman, 2000]. Dans certaines cellules, les IAPs catalysent leur propre ubiquitination et dégradation mais aussi d'autres protéines importantes de l'apoptose comme Smac/Diablo et la Caspase-3 active (Palaga et Osborne, 2002 ; Yang et Li, 2000 ; Hu et Yang, 2003 ; Suzuki *et coll.*, 2001 ; Li *et coll.*, 2002 ; Saelens *et coll.*, 2004).

Une étude récente montre que la protéine XIAP joue un rôle en amont de la mitochondrie dans la régulation de l'apoptose induite via les récepteurs de mort cellulaire. En effet, XIAP inhibe la boucle d'amplification dépendante de la Caspase-3 (Figure 21) (Wilkinson 2004). Ainsi, XIAP protégerait les cellules de l'apoptose et favoriserait la capacité de prolifération à long terme des cellules stimulées par Fas.

2.4.5.2. Les protéines FLIP

Les IAPs ne sont pas les seuls inhibiteurs naturels des Caspases. Une autre famille de protéines virales, les protéines FLIP (FLICE Inhibitory Proteins) sont capables d'inhiber les Caspases au niveau de la voie extrinsèque de l'apoptose. A l'origine, ces protéines ont été identifiées chez le virus de l'herpès et le virus molluscipox, deux virus à ADN (Bertin *et coll.*, 1997 ; Thome *et coll.*, 1997). Ces protéines possèdent deux domaines DED leur permettant de se lier aux prodomaines des Caspases-8 et -10. Cette liaison inhibe leur recrutement au niveau des récepteurs de mort, notamment Fas et TNFRI (Bump *et coll.*, 1995). Il existe une grande variété de transcrits de FLIP et donc plusieurs isoformes chez l'humain (c-FLIP pour cellular FLIP). La forme courte ne présente que deux domaines DED et ressemble structurellement à v-FLIP (virus FLIP). A l'inverse, la forme longue (FLIPL) possède, en plus des deux domaines DED, un domaine structural similaire à la Caspase-8 mais avec un site enzymatique inactif. Cependant, la protéine c-FLIP a été décrite comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu *et coll.*, 1997 ; Irmeler *et coll.*, 1997 ; Rasper *et coll.*, 1998) ou induire l'apoptose (Han *et coll.*, 1997 ; Inohara *et coll.*, 1997 ; Shu *et coll.*, 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. Néanmoins, dans des conditions physiologiques, c-FLIP semble fonctionner comme un inhibiteur de la Procaspase-8 en bloquant le complexe DISC (Krueger *et coll.*, 2001 ; Krueger *et coll.*, 2001). Il a été suggéré que la sensibilité des cellules T à l'apoptose induite par Fas était corrélée avec la diminution du taux d'ARNm de c-FLIP (Irmeler *et coll.*, 1997).

Ainsi, le rôle régulateur de c-FLIP dans l'apoptose est très complexe. En effet, son rôle pro- ou anti-apoptotique semble dépendre de la nature du transcrit, du type cellulaire ainsi que du niveau d'expression de chacune des isoformes.

2.5. Les mécanismes de l'apoptose

Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose (Figure 22). La première, appelée voie extrinsèque, est déclenchée par l'activation des récepteurs de mort à la surface de la cellule, ce qui provoque le recrutement et l'activation de la Caspase-8 (Kischkel *et coll.*, 1995). La deuxième est la voie intrinsèque, elle met en jeu la perméabilité mitochondriale et elle est régulée par les protéines de la famille de Bcl-2 (B-Cell Lymphoma protein 2). L'activation de cette voie initie le relargage du cytochrome c vers le cytosol. Il y a alors formation de l'apoptosome. Ces deux voies, extrinsèque et intrinsèque, aboutissent à l'activation des Caspases. Aujourd'hui, d'autres voies de signalisation s'ajoutent

à celles précédemment décrites comme la voie intrinsèque passant par le Réticulum Endoplasmique et la voie indépendante des Caspases qui met en jeu une protéine nucléaire appelée AIF (Apoptosis Inducing Factor).

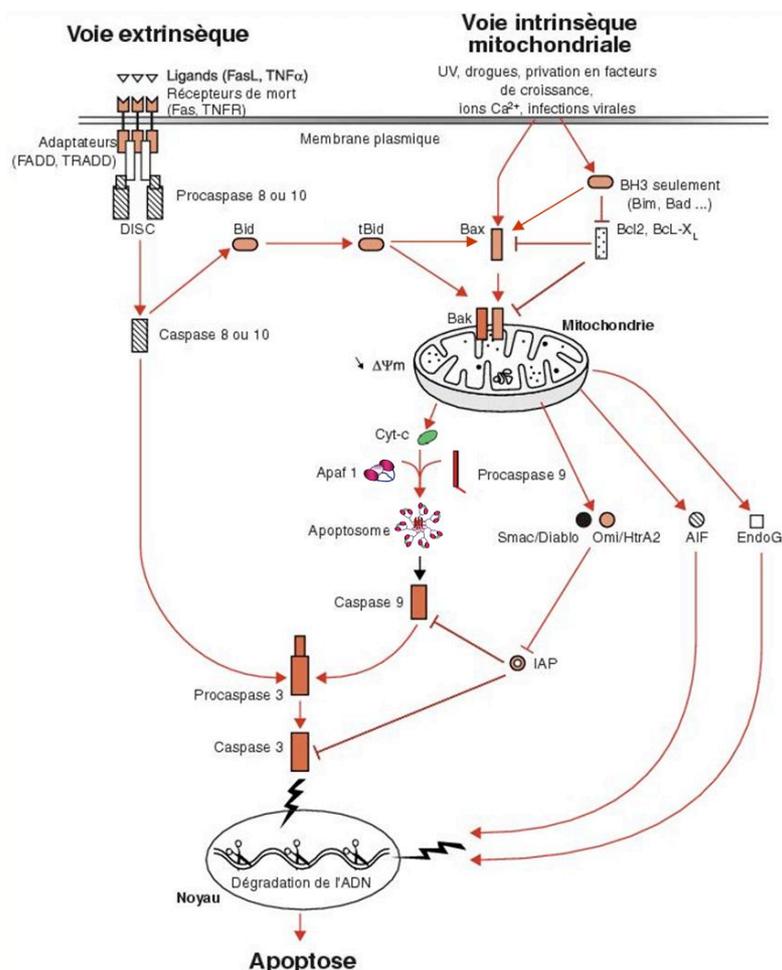


Figure 22 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

2.5.1. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs à domaine de mort

Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). Parmi ces récepteurs impliqués dans la mort cellulaire, trois ont été largement étudiés : les récepteurs au TNF (TNFR), les récepteurs Fas (CD95/Fas, Apo1) et les récepteurs TRAIL (DR4, DR5). Ces récepteurs possèdent un domaine de mort « Death Domain » intracytoplasmique (domaine **DD**, en vert sur la Figure 23), qui est essentiel à la transduction du signal apoptotique (Tartaglia *et coll.*, 1993 ; Chaudhary *et coll.*, 1997 ; Nagata et Golstein, 1995).

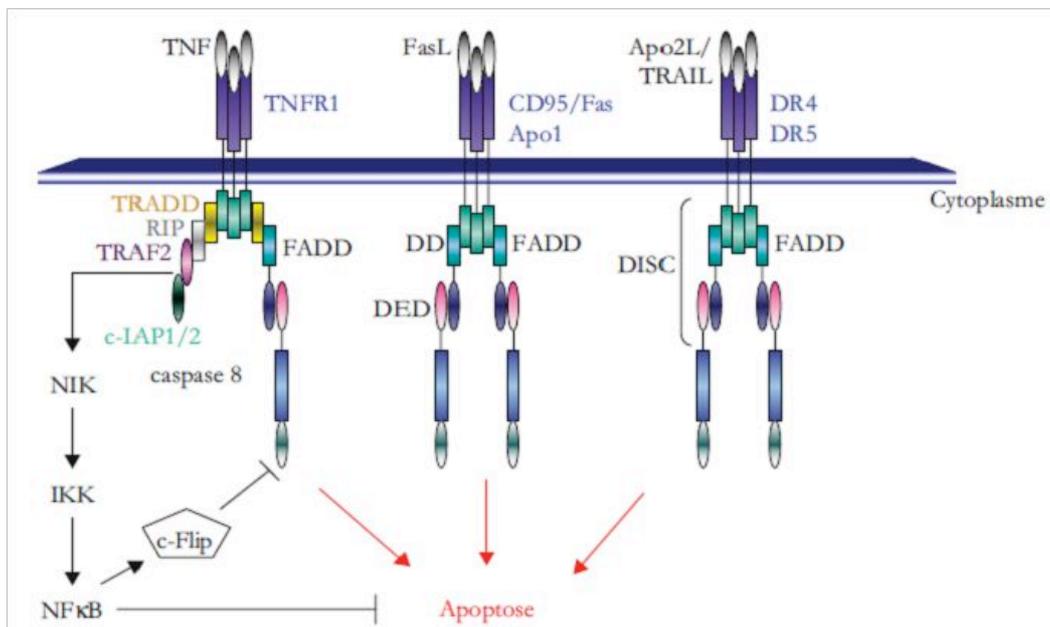


Figure 23 : Voie des récepteurs de mort (Segal-Bendirdjian 2005)

La fixation des ligands sur les récepteurs provoque le recrutement de protéines adaptatrices par association de leur domaine DD respectif, telles que les protéines FADD (Fas-Associating protein with Death Domain) et TRADD (TRAIL Receptor Associating protein with Death Domain). Ces protéines adaptatrices possèdent également un domaine effecteur de mort **DED** (Death Effector Domain). Ce domaine est responsable des interactions entre les protéines adaptatrices et les Procaspases-8 et -10 *via* leurs domaines DED (Boldin *et coll.*, 1995 ; Chinnaiyan *et coll.*, 1995). L'association des Caspases initiatrices avec le récepteur activé *via* les protéines adaptatrices forme le complexe **DISC**. Le rapprochement des Caspases initiatrices permet leur activation à travers un processus d'auto-catalyse. La forme active de la Caspase est alors libérée dans le cytoplasme (Salvesen et Dixit, 1999) et active directement les Caspases exécutrices -3, -6 et -7.

2.5.2. Voie intrinsèque, voie mitochondriale ou de la famille de Bcl-2

Les mitochondries sont fondamentalement impliquées dans la survie cellulaire. Elles participent au métabolisme énergétique cellulaire responsable de la synthèse d'ATP *via* la chaîne respiratoire. Cependant, ces organites possèdent également un rôle central dans le contrôle de l'apoptose. En effet, des études biochimiques montrent qu'un certain nombre de

protéines mitochondriales sont capables d'activer directement le programme apoptotique (Liu *et coll.*, 1996). Ces études montrent aussi la localisation mitochondriale des protéines de la famille de Bcl-2, qu'elles soient pro- apoptotiques, comme Bax et Bak (Akao *et coll.*, 1994 ; Krajewski *et coll.*, 1993), ou anti-apoptotiques, comme Bcl-2 et Bcl-xL (Hsu *et coll.*, 1997 ; Wolter *et coll.*, 1997).

2.5.2.1. Adressage de Bax à la mitochondrie et perméabilisation de la mitochondrie

En conditions normales, Bax est bloqué dans une conformation où les hélices H α 1 en N-terminal ou H α 9 en C-terminale ne sont pas exposées (Youle et Strasser, 2008). Dans cette conformation appelée CLIC (Cytosolic Locked In Conformation), Bax est monomérique et ne peut interagir avec d'autres protéines (Lalier *et coll.*, 2007 ; Er *et coll.*, 2006). En effet, l'hélice H α 1 est très proche du domaine BH3/H α 2 via des interactions électrostatiques. De plus, l'hélice H α 9 est dans la poche hydrophobe H α 5-H α 6, prévenant ainsi l'exposition cytosolique de ce domaine d'insertion membranaire.

De nombreux dommages intracellulaires (production de radicaux oxygénés, présence de mutations dans l'ADN génomique, inhibition d'enzymes clés...), générés lors de l'exposition des cellules à des agents chimiques, physiques, bactériens, viraux ou lors de la privation en facteurs de croissance, constituent des signaux pro-apoptotiques. Ces signaux permettent l'exposition de l'hélice H α 1 de Bax. Cette hélice, présentant un domaine d'adressage à la mitochondrie (Cartron *et coll.*, 2003) permet à Bax d'interagir avec des récepteurs mitochondriaux. Simultanément, les hélices H α 5-H α 6 sont libérées de l'hélice H α 9 et permettent l'insertion de Bax dans la membrane externe de la mitochondrie (Lalier *et coll.*, 2007 ; Er *et coll.*, 2006).

Une fois insérée dans la mitochondrie, Bax adopte une autre conformation, appelée CLAC (Cytochrome c Liberation Associated Conformation). Bax s'oligomérisse et le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) diminue. La matrice mitochondriale gonfle, le métabolisme énergétique aérobie est interrompu et la membrane mitochondriale externe se perméabilise. Les protéines apoptogéniques solubles intermembranaires sont alors libérées dans le cytosol (Green et Kroemer, 2004 ; Youle et Strasser, 2008). Certains de ces facteurs participent à l'activation des Caspases, soit par effet direct (cytochrome c), soit en neutralisant les inhibiteurs cytosoliques de celles-ci (Smac/Diablo, HtrA2/Omi). D'autres favorisent la

condensation et la fragmentation nucléaire (AIF, EndoG) (Ravagnan *et coll.*, 2002 ; van Gurp *et coll.*, 2003).

2.5.2.2. Libération du cytochrome c et formation de l'apoptosome

Le cytochrome c, décrit pour la première fois en 1930 par Keilin, est une petite protéine de 12 kDa codée par le génome nucléaire. Cette protéine est importée dans la mitochondrie sous la forme d'une apoprotéine *via* le complexe de translocation de la membrane externe, le complexe TOM (Translocase of the Outer Mitochondrial membrane) (Diekert *et coll.*, 2001). Une fois dans l'espace intermembranaire, l'apocytochrome c est converti en holocytochrome c fonctionnel sous l'action de la cytochrome c hème lyase.

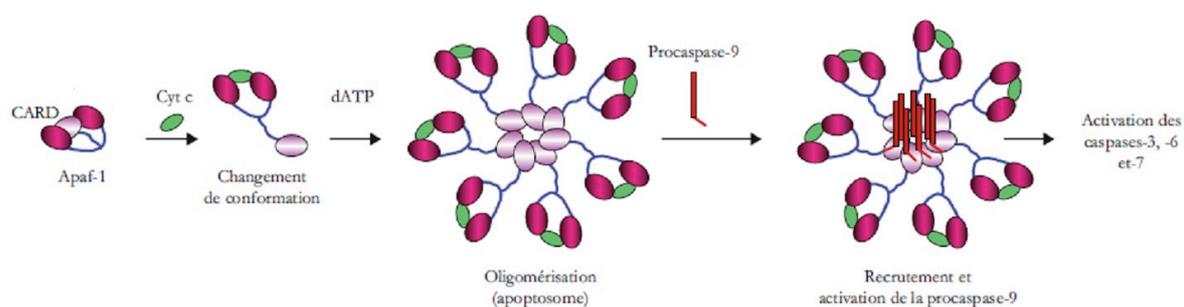


Figure 24 : Formation de l'apoptosome

Le cytochrome c est un composant essentiel à la chaîne respiratoire au cours de la phosphorylation oxydative. Il intervient comme transporteur d'électrons entre le complexe III (cytochrome c réductase) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). Son implication dans l'apoptose a été mise en évidence en 1996. En effet, l'équipe de Wang montre que l'holocytochrome c est nécessaire à l'activation de la Caspase-9 dans un système acellulaire (Liu 1996). Ce résultat a été confirmé de très nombreuses fois, notamment par le fait que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 soit capable de bloquer la libération de cytochrome c ainsi que l'activation des Caspases (Kluck *et coll.*, 1997 ; Yang *et coll.*, 1997). En revanche, les inhibiteurs des Caspases n'ont pas d'effet sur la libération de cytochrome c et ne provoquent qu'un retard des signes morphologiques et biochimiques de l'apoptose.

Pendant l'apoptose, la libération de cytochrome c est un processus coordonné et rapide (Goldstein *et coll.*, 2000 ; Martinou *et coll.*, 2000) nécessitant 2 étapes : (i) la solubilisation du cytochrome c dans l'espace intermembranaire mitochondrial et (ii) la libération du

cytochrome c dans le cytosol après la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par Bax (Ott *et coll.*, 2002).

Une fois présent dans le cytosol, le cytochrome se lie à la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), ce qui induit un changement de conformation d'ATP-dépendant de cette protéine. L'APAF-1 s'oligomérisent alors sous la forme d'un heptamère (Jiang et Wang, 2000). Ce complexe ainsi formé facilite le recrutement de la Procaspase-9 au travers d'interactions entre leurs domaines CARD (en rose pâle sur la Figure 24) et permet la formation du complexe appelé apoptosome (Figure 24) (Hengartner, 2000 ; Strasser *et coll.*, 2000). La Procaspase-9 s'auto-protéolyse puis active à son tour les Caspases effectrices -3, -6 et -7 (Li *et coll.*, 1997). Ainsi, la mitochondrie participe directement à la cascade d'activation des Caspases *via* la libération du cytochrome c.

2.5.2.3. Rôles des protéines Smac/Diablo et Omi/Htra2

L'activation de l'apoptosome n'est pas toujours suffisante pour engendrer l'activation de la cascade apoptotique, du fait que les Caspases sont maintenues inactives par les IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) (développé dans le chapitre B.2.4.5.1 de l'introduction).

Cependant, au cours du processus apoptotique mitochondriale, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe permet de libérer de nombreux facteurs tels que Smac/Diablo, Omi/Htra2, AIF ou l'EndoG. (Figure 25) (Verhage *et coll.*, 2000 ; Du *et coll.*, 2000 ; Hedge et Williams, 2002 ; Suzuki *et coll.*, 2001).

La protéine Smac (Second Mitochondrial Activator of Caspases) et son orthologue humain Diablo (Direct IAPs Binding Protein with Low pI) sont exprimés sous forme de précurseurs de 29 kDa et sont importés dans l'espace intermembranaire mitochondrial par leur séquence d'adressage amino-terminale. Lors d'un stimulus apoptotique, le peptide signal de Smac/Diablo est clivé, ce qui révèle un domaine de liaison aux IAP, le domaine IBM (IAP Binding Motif). Ce domaine N-terminal de quatre résidus (Ala-Val-Pro-Ile) interagit avec les domaines BIR de différents IAP. Smac/Diablo est libéré dans le cytosol sous forme de dimère où il agit en tant que compétiteur des Caspases pour la liaison aux IAPs (Figure 25). Smac/Diablo se lie au travers d'une interaction entre les domaines IBM et BIR (Huang *et coll.*, 2003). Ceci aboutit à une potentialisation de l'activation des Caspases par levée de l'inhibition dirigée contre celles-ci. Toutefois, les souris déficientes en Smac/Diablo ont un phénotype normal et ne présentent pas de défaut de développement. De plus, les cellules

issues de ces souris répondent normalement aux stimuli apoptotiques (Ott *et coll.*, 2002). Ces observations suggèrent ainsi l'existence de facteurs redondants pouvant compenser la perte de Smac/Diablo.

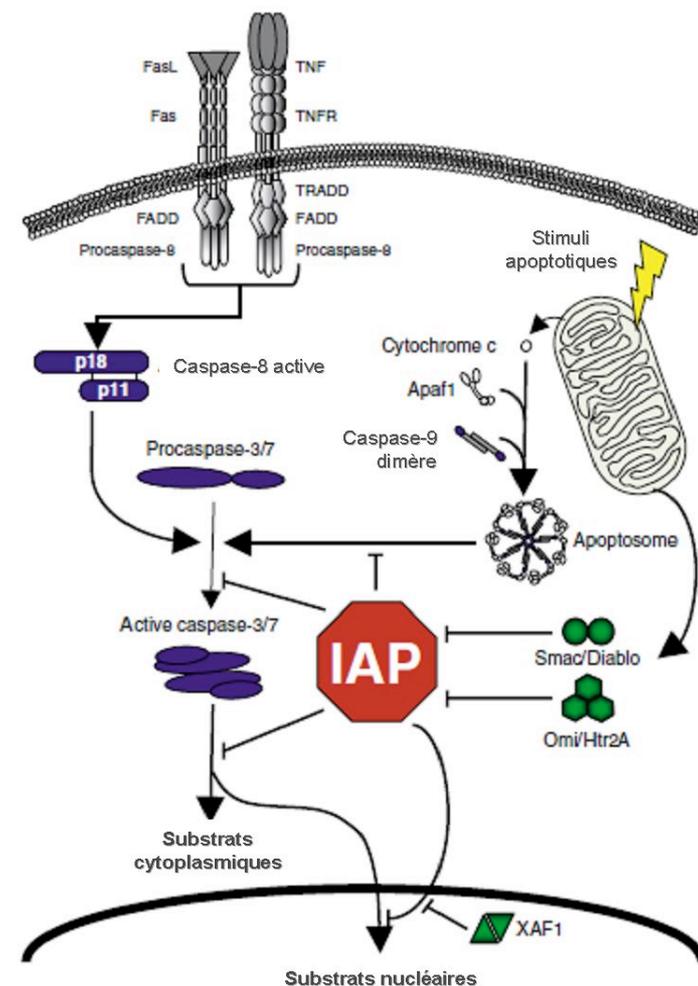


Figure 25 : Rôle régulateur des protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2 dans les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (D'après Liston *et coll.*, 2003) .

La protéine Omi/Htra2 est également codée par le génome nucléaire sous forme d'un précurseur possédant dans sa partie N-terminale une séquence de localisation mitochondriale suivi d'un domaine transmembranaire. Le clivage de ce domaine génère la protéine mature (Suzuki *et coll.*, 2001 ; Hedge et Williams, 2002 ; Verhage *et coll.*, 2000). Après induction de l'apoptose, cette protéine est libérée dans le cytoplasme. D'une façon similaire à Smac/Diablo, Omi/HtrA2 lève l'inhibition exercée par les IAP sur les Caspases-3, -7 et -9 par un mécanisme de compétition et facilite ainsi leur activation (Figure 25).

2.5.2.4. Rôles des protéines AIF et EndoG

D'autres protéines libérées lors de la perméabilisation mitochondriale participent également à la mort cellulaire.

L'AIF est une flavoprotéine codée par le génome nucléaire sous forme d'un précurseur contenant une séquence d'adressage mitochondriale qui est clivée après son importation dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Au cours de l'apoptose, l'AIF est libéré de la mitochondrie et la présence d'une séquence d'adressage nucléaire en C-terminal permet sa translocation nucléaire (Ye *et coll.*, 2002). De plus, l'AIF possède de fortes charges électrostatiques positives. Ainsi l'AIF peut interagir avec l'ADN à sa surface et permettre la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN en fragments de taille élevée (Susin *et coll.*, 1999). Son rôle exact dans la mitochondrie est inconnu mais il est possible que paradoxalement l'AIF, au travers de son activité oxydoréductase, exerce une protection contre la mort cellulaire induite par le stress oxydatif (Klein *et coll.*, 2002).

L'endonucléase G (EndoG) est une nucléase de 30 kDa codée par le génome nucléaire. Elle comporte également une séquence d'adressage mitochondriale. Au cours de l'apoptose, cette protéine transloque de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le noyau, où elle induit la dégradation de l'ADN même en absence d'activité Caspase (Li *et coll.*, 2001). En outre, il semble que l'EndoG puisse coopérer avec des exonucléases et la DNase I (Widlak *et coll.*, 2001). Cependant, l'EndoG est incapable de générer seule la digestion totale de l'ADN observée par l'équipe de Vandenabeele (van Loo *et coll.*, 2001).

La présence d'AIF et d'EndoG indique que l'apoptose peut être exécutée indépendamment de l'activation des Caspases. Toutefois, des études ont suggéré que la libération d'AIF et d'EndoG dans le cytosol nécessiterait l'activation des Caspases et serait donc plus tardive (Arnoult *et coll.*, 2003), contrairement au cytochrome c, Smac/Diablo et Omi/Htra2.

2.5.3. Voie intrinsèque passant par le Réticulum Endoplasmique

La mitochondrie ne semble pas être le seul organite responsable de l'induction d'une apoptose intrinsèque. L'équipe de Yuan a démontré qu'un stress induit au Réticulum Endoplasmique (RE) provoque la libération de Ca^{2+} des réservoirs cellulaires, ce qui déclenche l'apoptose. En effet, lors de l'induction d'un stress au RE, par ajout d'un ionophore à calcium (A23187) ou d'un inhibiteur des ATPases dépendantes du calcium (Thapsigargin), la Procaspase-12 est libérée du RE où elle était séquestrée. Une fois dans le cytosol, la proforme de 60 kDa est

clivée dans sa forme active qui induit à son tour la Procaspase-3 (Nakagawa *et coll.*, 2000) et déclenche la cascade apoptotique.

2.5.4. L'apoptose indépendante des Caspases

Pendant de nombreuses années, les Caspases ont été considérées comme indispensables au déroulement apoptotique. Cependant, plusieurs groupes observent que l'inhibition des Caspases ou l'ablation de leur activité dans certains modèles n'a aucun impact sur la survenue de l'apoptose (Assefa *et coll.*, 2000 ; Carmody et Cotter, 2000 ; Lorenzo *et coll.*, 1999 ; Mateo *et coll.*, 1999 ; Mathiasen *et coll.*, 1999). Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs enzymatiques sont impliqués dans certaines formes de l'apoptose. Par exemple, Bax et Bak peuvent tuer des cellules de mammifères en présence d'inhibiteurs de Caspases à large spectre (Xiang *et coll.*, 1996 ; McCarthy *et coll.*, 1997).

Plusieurs autres protéases autres que les Caspases sont impliquées dans la mort cellulaire. Certaines études montrent que la Calpaïne, une protéase dépendante du calcium, et le système ubiquitine-protéasome sont essentiels à certaines formes d'apoptose dans les thymocytes (Squier *et coll.*, 1994 ; Hirsch *et coll.*, 1998).

En outre, plusieurs organismes ne possédant pas de Caspases présentent des formes de mort cellulaire programmée de type I. Toutefois, des protéines dont les séquences possèdent une certaine homologie avec les Caspases ont été retrouvées chez ces organismes et ont été nommées paracaspases (présentes notamment chez *Caenorhabditis elegans*, *Dictyoselina discoideum* et quelques procaryotes) et métacaspases (chez les procaryotes, les levures, les protozoaires et les plantes) (Uren *et coll.*, 2000 ; Koonin et Aravind, 2002 ; Lamkanfi *et coll.*, 2002). La ressemblance de ces protéines avec les Caspases se limite au motif catalytique caractéristique Cys-His de la sous-unité p20 car elles ne possèdent pas de sous-unité p10. La métacaspase de *S.cerevisiae*, renommée YCA1 pour Yeast Caspase 1, possède un rôle similaire à celui des Caspases humaines au cours de l'apoptose. En plus d'une activation par clivage d'YCA1, le H₂O₂ induit une mort cellulaire programmée chez la levure, accompagnée d'une activité protéolytique similaire à celle des Caspases. Cette réponse est complètement inhibée par la suppression d'YCA1 ou fortement stimulée par sa surexpression. YCA1 est aussi associée à la mort dans les cultures vieillissantes des levures (Madeo *et coll.*, 2002).

3. AUTOPHAGIE OU MORT CELLULAIRE DE TYPE II

Le terme «autophagie» provient du grec *autos* pour soi-même et *phagein* pour manger, ce qui signifie se manger soi-même. L'autophagie a été mise en évidence et étudiée chez la levure, ce qui a permis de découvrir les gènes de la famille des Atg (autophagy-related gene). Ce mécanisme est conservé chez les Eucaryotes [pour revue, Levine et Klionsky, 2004].

Il existe trois types d'autophagie : l'autophagie influencée par des protéines chaperonnes, la micro-autophagie et enfin la macro-autophagie. Seule la macroautophagie sera développée dans la suite de ce manuscrit [pour revue, Yorimitsu et Klionsky, 2005].

3.1. Macroautophagie

3.1.1. Processus

Chez les mammifères, l'autophagie débute par la séquestration d'une portion de cytoplasme dans une vésicule composée d'une double membrane appelée membrane pré-autophagosomale ou phagophore (Figure 26). Cette double membrane s'allonge jusqu'à ce que ses extrémités fusionnent et forment une vésicule appelée autophagosome. Ces vésicules fusionnent avec les lysosomes pour former les autophagolysosomes. Cette fusion apporte alors à l'autophagosome les enzymes nécessaires à la dégradation de son contenu et les conditions de pH nécessaires au fonctionnement de ces enzymes. Cette étape de dégradation permet la production d'acides aminés, d'acides gras et de nucléotides pouvant être réutilisés pour de nouvelles biosynthèses et pour produire de l'énergie (Levine et Yuan, 2005 ; Yorimitsu et Klionsky, 2005).

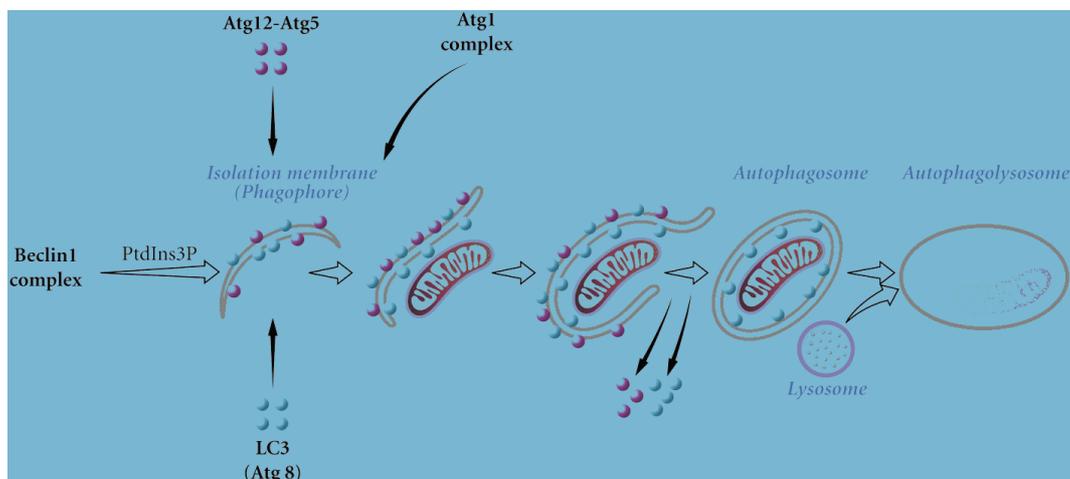


Figure 26 : Déroulement de l'autophagie (Pattingre *et coll.*, 2008).

Il a longtemps été considéré que les autophagosomes séquestraient, de façon non sélective, les constituants du cytoplasme et les organelles (Ogier-Denis et Codogno, 2003). Cependant, de nouveaux travaux suggèrent qu'il pourrait y avoir une séquestration sélective de certains constituants cellulaires tels que les mitochondries (Kissova *et coll.*, 2004 ; Priault *et coll.*, 2005), les peroxysomes [pour revue, Reggiori et Klionsky, 2005] ou des portions du noyau (Roberts *et coll.*, 2003). A l'heure actuelle, l'origine des autophagosomes est encore incertaine. Plusieurs équipes décrivent ces vacuoles comme étant formées à partir de la membrane du réticulum endoplasmique lisse (Dunn, 1990 ; Berg *et coll.*, 1998 ; Ueno *et coll.*, 1999). Néanmoins, d'autres études suggèrent que les pré-autophagosomes proviendraient de l'appareil de Golgi ou de lipides néosynthétisés pour former une organelle appelée phagophore (Fengsrud *et coll.*, 2000 ; Mizushima *et coll.*, 2001 ; Fengsrud *et coll.*, 2000).

3.1.2. Rôles physiologiques

3.1.2.1. Maintien de l'homéostasie

L'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Elle permet la dégradation des protéines à longue durée de vie et la dégradation des organelles non nécessaires ou endommagées. Ces dernières années, l'autophagie est apparue comme un mécanisme pouvant agir contre le vieillissement cellulaire. En effet, il a été observé que des mutations dans la voie de signalisation de l'insuline chez *Caenorhabditis elegans* ainsi qu'une restriction calorique permettent d'allonger sa durée de vie, or ces deux modifications régulent positivement l'autophagie. Par ailleurs, il a été démontré que ces mutants de *C. elegans* ont une durée de vie prolongée et qu'ils sont résistants au stress oxydatif après soumission à une restriction calorique. Dans ces conditions, l'autophagie assure la dégradation des mitochondries endommagées. Elle diminue le niveau des espèces actives de l'oxygène (ROS) et protège les cellules contre le stress oxydatif. Tout cela contribue à l'allongement de la durée de vie de différentes espèces animales (Levine et Klionsky, 2004).

3.1.2.2. Développement

Une carence nutritive, une augmentation de température ou une densité cellulaire trop importante sont de puissants inducteurs de l'autophagie. Ces stress sont également capables d'induire une différenciation et/ou un développement dans certaines espèces d'Eucaryotes inférieurs afin de procurer un avantage sélectif face à ces conditions défavorables (Figure 27).

Il est donc apparu intéressant de déterminer si le processus autophagique pouvait être impliqué dans ces mécanismes.

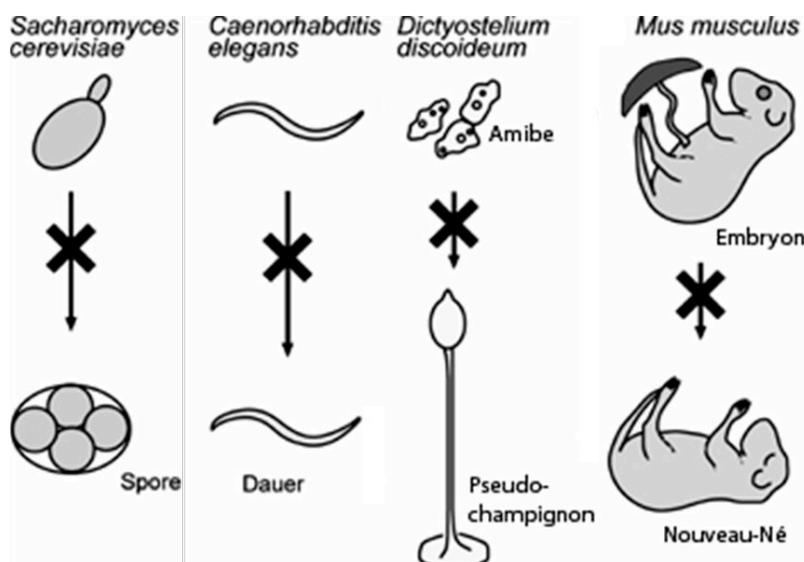


Figure 27 : Autophagie et développement (d'après Mizushima, 2005).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* et *Dictyostelium discoideum*, il a été démontré que les gènes *ATG* jouaient un rôle clé dans cette différenciation induite par un stress. En effet, certains stress extérieurs provoquent la sporulation chez *S. cerevisiae*. Des mutants pour les gènes *ATG* n'arrivent plus à sporuler lors d'une carence nutritive. Chez *C. elegans*, un stress provoque le passage en larve *dauer*, qui est aussi une forme de résistance. Des mutations de gènes *ATG* n'empêchent pas l'initiation de cette transformation mais bloquent son développement normal et inhibent sa survie. Lors d'une carence nutritive, *D. discoideum* se présente sous la forme de colonies multicellulaires. Des mutations dans les gènes *ATG* diminuent leur survie et déstructurent leur assemblage (Levine et Klionsky, 2004).

L'autophagie est également impliquée dans le développement d'organismes eucaryotes supérieurs. Par criblage de différents mutants *ATG*, il apparaît que les gènes *ATG* sont importants dans les étapes précoces du développement chez la drosophile et la souris. Dans le cas de la drosophile, des ARNs interférences dirigés contre *ATG1*, *ATG6*, *ATG8* et *ATG18* empêchent la métamorphose (*ATG1*) ou induisent une mort très précoce, avant même le premier stade larvaire. Dans celui de la souris, les délétions d'*ATG6* ou d'*ATG5* provoquent respectivement une mortalité embryonnaire précoce et néonatale (Mizushima, 2005).

3.2. Les protéines de la famille des Atg

A ce jour, trente-et-un gènes de l'autophagie ont été identifiés chez la levure *S. cerevisiae* mais tous les homologues n'ont pas encore été caractérisés chez les mammifères. Parmi eux, 18 gènes *ATG* jouent un rôle dans la formation de l'autophagosome *ATG1–ATG10*, *ATG12–ATG14*, *ATG16–ATG18*, *ATG29*, and *ATG31* (Klionsky *et coll.*, 2003 ; Kuwana *et coll.*, 2005 ; Kuwana *et coll.*, 2005).

Chacun de ces facteurs possède un rôle spécifique lors de la formation, l'élongation et la maturation des autophagosomes. Les protéines Atg sont classées en différents groupes selon leur fonction : la kinase Atg1 et ses protéines régulatrices (Atg1, Atg13, Atg17), deux systèmes de conjugaison semblables à celui de l'ubiquitination (systèmes Atg12 et Atg8, Atg3, Atg4, Atg5, Atg7, Atg10, Atg12, Atg16), un complexe phosphatidylinositol 3-kinase (Vps34, Vps15, Atg6/ Vps30, Atg14), et un autre groupe de protéines (Atg2, Atg9, Atg18) (Noda *et coll.*, 2002 ; Levine et Klionsky, 2004). Seules 15 protéines Atg humaines sont présentées ici (Tableau 2).

3.3. Régulation de l'autophagie

En conditions normales, l'activation de la voie de la PI3K par les hormones et de la kinase mTOR par les acides aminés. ont un effet inhibiteur sur l'autophagie (Meijer et Codogno, 2004). La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est une serine/thréonine kinase impliquée dans la croissance cellulaire, la prolifération, la mobilité ainsi que la transcription et la synthèse protéique (Beevers *et coll.*, 2006 ; Hay et Sonenberg, 2004 ; Land et Tee, 2007). Cette protéine est donc une kinase importante dans la survie cellulaire. La protéine mTOR est également la principale kinase impliquée dans la régulation de l'autophagie. Elle appartient à la famille des PIKK (Phosphatidylinositol-3-Kinase related Kinase). A l'inverse des PI3K qui phosphorylent des phosphoinositides, mTOR phosphoryle uniquement des protéines.

Gene	Homologue humain	Etape	Rôle dans l'autophagie	Interactions	Références
ATG1	ULK1	Induction	Atg1 est une protéine kinase à sérine/thréonine qui participe à la régulation et à la formation des vésicules.	Atg13, Atg11	(Larsen et Sulzer, 2002) ; (Lemasters <i>et coll.</i> , 2002)
ATG2	ATG2	Formation/ Elongation	Atg2 interagit avec Atg9 et participe ainsi à la formation de l'autophagosome	Atg9, Atg18	(Obara <i>et coll.</i> , 2008)
ATG3	ATG3 APG3	Formation/ Elongation	Atg3 est une enzyme E2-like, semblable à une enzyme conjuguant l'ubiquitine. Atg3 lie de façon covalente Atg8/LC3 à la phosphatidyléthanolamine	Atg7, Atg8, Atg12	(Liang <i>et coll.</i> , 1999) ; (Lockshin et Zakeri, 2002) ; (Mann et Hammarback, 1994)
ATG4	ATG4A HsATG4A HsAPG4A autophagin-2	Formation/ Elongation	Atg4 clive Atg8/LC3 en C-terminal pour exposer un résidu glycine permettant la conjugaison	Atg8	(Matsuura <i>et coll.</i> , 1997) ; (Meijer et Dubbelhuis, 2004)
ATG5	ATG5 APG5	Formation/ Elongation	Atg5 est liée de façon covalente à Atg12, clive Atg16. C'est une protéase à cystéine	Atg12, Atg16	(Mizushima <i>et coll.</i> , 1998) ; (Mizushima <i>et coll.</i> , 2001) ; (Mizushima <i>et coll.</i> , 2003)
ATG6	Beclin 1	Formation/ Elongation	Atg6 appartient au complexe phosphatidylinositol-3-kinase de classe III, participe à la formation de l'autophagosome en interagissant avec Atg14	Atg14, Vps15, Vsp34	(Mizushima <i>et coll.</i> , 1999) ; (Mizushima <i>et coll.</i> , 2001)
ATG7	ATG7 HsGSA7 APG7	Formation/ Elongation	Atg7 est une enzyme E1-like, semblable à une enzyme conjuguant l'ubiquitine. Atg7 active Atg8/LC3 et Atg12 avant leur conjugaison	Atg3, Atg8, Atg12	(Mizushima <i>et coll.</i> , 2001) ; (Mizushima <i>et coll.</i> , 2004) ; (Mizushima <i>et coll.</i> , 2002) ; (Mizushima <i>et coll.</i> , 2003) ;
ATG8	LC3 MAP1LC3 ATG8L APG8L GABARAP GATE-16	Formation/ Elongation	Atg8/LC3 possède une structure similaire à l'ubiquitine. Atg8/LC3 est conjuguée avec la phosphatidyléthanolamine et forme l'autophagosome	Atg3, Atg4, Atg7	(Mariño <i>et coll.</i> , 2003) ; (Nishino, 2003) (Meijer et Dubbelhuis, 2004) ; (Ogier-Denis et Codogno, 2003)
ATG9	ATG9	Formation/ Elongation	Atg9 participe à la formation de la membrane de l'autophagosome. C'est une protéine transmembranaire associée à Atg2	Atg2, Atg18	(Noda <i>et coll.</i> , 2000) ; (Lang <i>et coll.</i> , 2000)
ATG10	ATG10	Formation/ Elongation	Atg10 est une enzyme E2-like, semblable à une enzyme conjuguant l'ubiquitine. Atg10 lie de façon covalente Atg12 à Atg5	Atg12	(Nemoto <i>et coll.</i> , 2003) (Ohsumi, 2001) ; (Okazaki <i>et coll.</i> , 2000)
ATG12	ATG12	Formation/ Elongation	Atg12 possède une structure similaire à l'ubiquitine. Atg12 est conjuguée à Atg5.	Atg3, Atg5, Atg7, Atg10, Atg16	(Mizushima <i>et coll.</i> , 2001) ; (Mizushima <i>et coll.</i> , 2003) ; (Nemoto <i>et coll.</i> , 2003)
ATG13	ATG13	Induction	Atg13 induit l'autophagie en modulant la réponse d'Atg1	Atg1	(Kamada <i>et coll.</i> , 2000)
ATG14	ATG14	Formation/ Elongation	participe à la formation de l'autophagosome en interagissant avec Atg6	Atg6, Vps15, Vps34	(Kihara <i>et coll.</i> , 2001)
ATG16	ATG16L1 (APG16L)	Formation/ Elongation	Atg16 interagit Atg5 et s'homo-oligomérisent en un complexe tétramérique	Atg5, Atg12, Atg16	(Otto <i>et coll.</i> , 2003) ; (Otto <i>et coll.</i> , 2004)
ATG17	ATG17				
ATG18	ATG14	Formation/ Elongation	PtsIns-3-P binding protein	Atg2, Atg9	(Dove <i>et coll.</i> , 2004)

Tableau 2 : Les gènes ATG, leurs homologues humains et leurs fonctions protéiques au cours de l'autophagie

Lors d'une carence en glucose, une diminution du niveau d'ATP se fait ressentir par la cellule. En effet, le rapport ATP/ADP diminue alors que le rapport AMP/ATP augmente, ce qui active l'AMP kinase (AMPK). De plus, la carence en ATP favorise les interactions entre l'AMPK et le complexe TSC1/TSC2, ce qui aboutit à la phosphorylation de TSC2. Une fois activée, cette protéine inhibe mTOR entraînant ainsi une stimulation de l'autophagie et une inhibition de la p70S6 kinase. L'absence de facteurs de croissance inhibe la voie de signalisation des PI3K de classe I, ce qui aboutit également à l'activation du complexe TSC1/TSC2 et à l'inhibition de mTOR (figure 28).

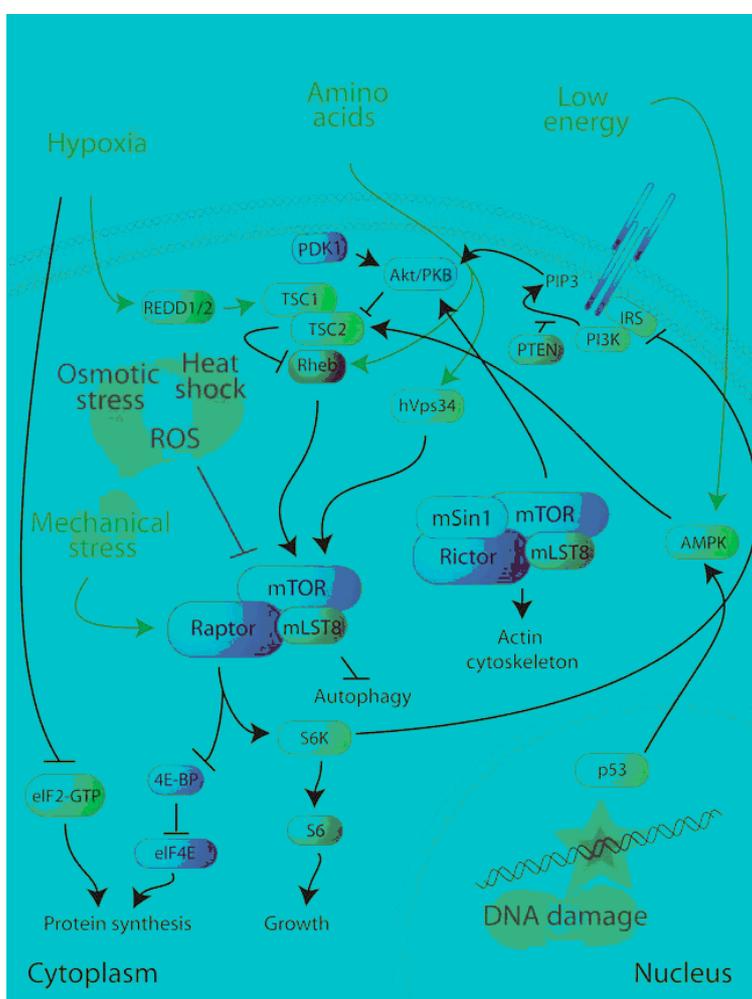


Figure 28 : Voie de signalisation de mTOR (D'après Reiling & Sabatini, 2006).

Concernant la carence en acides aminés, l'inhibition de mTOR est indépendante du complexe TSC1/TSC2. Elle semble passer par l'activation du complexe PI3K de classe III/Atg6/Beclin

1 (développé dans le chapitre B.3.4.2 de l'introduction) et par l'inhibition directe ou indirecte de mTOR (figure 28).

3.4. La formation de l'autophagosome

Les protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome sont recrutées de façon hiérarchique et transitoire. Une partie des protéines Atg est même recyclée pour participer à la formation de nouvelles vésicules autophagiques.

La formation des autophagosomes est régulée par deux complexes. Le premier est composé entre autres de la sérine /thréonine kinase Atg1, elle-même régulée par mTOR et d'Atg13. Le second complexe est composé d'Atg6/Beclin 1 et d'une phosphoinositide 3 kinase de classe III (PI3K de classe III). Ce dernier est impliqué dans la formation des autophagosomes.

3.4.1. Initiation de l'autophagie

Lorsqu'elle est activée, mTOR provoque l'hyperphosphorylation d'Atg13 qui ne peut plus être associée à Atg1 (ULK1), inhibant ainsi l'autophagie. A l'inverse, lors d'une carence nutritive, mTOR est inhibée. Dans ce cas, la protéine Atg13 est rapidement déphosphorylée et le complexe Atg1-Atg13 peut alors se former (Kamada *et coll.*, 2000). Il y a alors recrutement d'autres protéines Atg (Atg11, Atg17) permettant ainsi l'activation d'Atg1 et l'induction du processus autophagique (Figure 29).

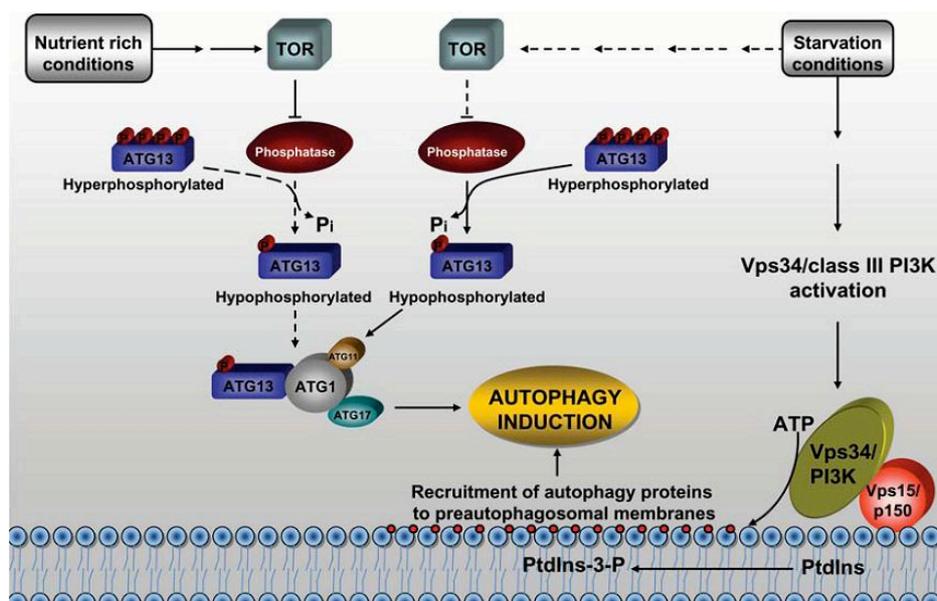


Figure 29 : Initiation de l'autophagie (Mariño et López-Otín, 2004).

3.4.2. Le rôle pro-autophagique du complexe PI3K-Beclin 1

Les PI3K sont des enzymes capables de phosphoryler un groupe hydroxyle du cycle inositol. Réparties en trois classes, seules deux sont impliquées dans l'autophagie, les classes I et III (Petiot *et coll.*, 2000). Activées par la présence de facteurs de croissance *via* Akt, les PI3K de classe I inhibent le déroulement de l'autophagie. A l'inverse, les PI3K de classe III activent le processus autophagique par leurs interactions avec Atg6/Beclin 1 lors d'une carence nutritive par exemple.

Une PI3K de classe III, présente au niveau du réseau trans-golgien, est capable d'interagir avec Atg6/Beclin 1. Elle est composée de la sous-unité catalytique hVSP34 (human Vacuolar Sorting Protein 34) et de la sous-unité régulatrice hVSP15 (human Vacuolar Sorting Protein 15). Cette protéine assure la formation de phosphoinositide-3-phosphate (PI-3-P) à partir de phosphoinositides (PI). La présence de ces PI-3-P permet le recrutement des protéines Atg au niveau de la membrane des pré-autophagosomes (figure 30).

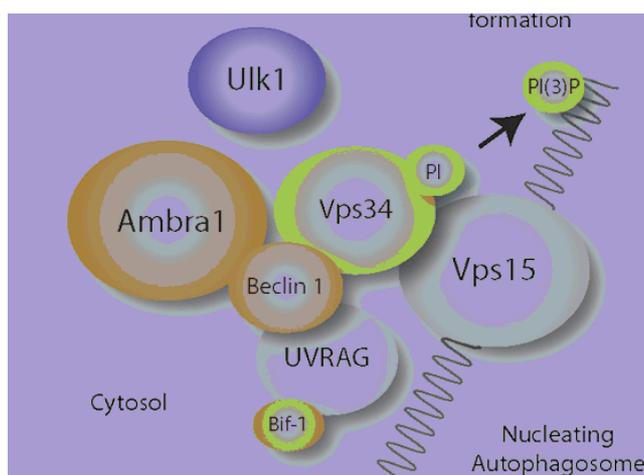


Figure 30 : Le complexe PI3K/Beclin 1 (d'après Cecconi et Levine 2008) .

La protéine Atg6/Beclin 1 est une protéine majeure dans l'initiation de l'autophagie. Elle a été caractérisée pour sa capacité à interagir avec Bcl-2 et Bcl-xL par double-hybride chez la levure (Liang *et coll.*, 1998 ; Liang *et coll.*, 1999). Le complexe PI3K/Beclin contient de nombreuses protéines essentielles à l'activité kinase de Beclin 1, incluant Atg6/Beclin 1, hVps34, hVps15, UVRAG (*UV irradiation Resistance Associated Gene*), Ambra1 et Bif1 (Figure 30). Ce complexe assure le recrutement des protéines autophagiques solubles structurales sur la membrane des phagophores par la synthèse de PI-3-P (Kihara *et coll.*, 2001) permettant ainsi l'élongation de la membrane.

3.4.3. Les systèmes de conjugaison et leur implication dans la formation des autophagosomes

La synthèse des autophagosomes nécessite les systèmes de conjugaison Atg5~Atg12 et Atg8~PE, ou LC3 ~ Phosphatidyl Ethanolamine (Figure 31).

La liaison entre Atg5 et Atg12 est similaire à une ubiquitination (Mizushima *et coll.*, 2001). Elle nécessite l'activation des protéines Atg7 et Atg10 qui fonctionnent respectivement comme l'enzyme d'activation E1 et comme l'enzyme de conjugaison E2 du système de d'ubiquitination des protéines. Dans un premier temps, la protéine Atg12 est activée par Atg7 puis transférée à Atg10. La protéine Atg12 est alors conjuguée à Atg5 par un résidu lysine et Atg10 est libéré dans le cytoplasme (Shintani *et coll.*, 1999). Le conjugué Atg5~Atg12 se fixe alors à la membrane des pré-autophagosomes (Tanida *et coll.*, 2004) et interagit de façon non covalente avec la protéine Atg16. Cette association permet le recrutement du second complexe LC3~PE et initie ainsi l'élongation des autophagosomes (Mizushima *et coll.*, 2001).

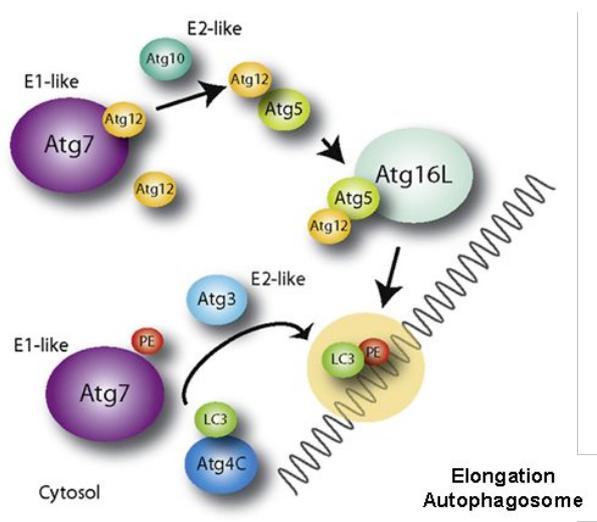


Figure 31 : Systèmes de conjugaison Atg5~Atg12 et LC3 ~PE (Cecconi et Levine, 2008).

Dans un premier temps, le précurseur LC3 est clivé par la protéase à cystéine Atg4 en LC3-I. Comme Atg12, LC3-I est activée par Atg7 et transférée à la protéine Atg3, enzyme E2-like. Cette protéine catalyse la conjugaison covalente avec le PE (Ichimura *et coll.*, 2000). Le conjugué LC3~PE est aussi appelé LC3-II.

Une fois la maturation terminée, le conjugué Atg5~Atg12 est recyclé vers le cytoplasme. De même, la protéine Atg4 hydrolyse la liaison entre LC3 et PE pour permettre le recyclage de la

fraction LC3 associée à la face externe des autophagosomes. La fraction du conjugué LC3~PE qui reste associée à la membrane interne des autophagosomes constitue alors un marqueur spécifique de ces vésicules (Kabeya *et coll.*, 2000).

3.5. Autophagie ou mort cellulaire programmée de type II

L'autophagie a été initialement décrite comme étant un processus de survie face à une carence nutritive (Boya *et coll.*, 2005 ; Lum *et coll.*, 2005). Cependant, une autodigestion trop importante des cellules conduit à leur mort, appelée mort cellulaire programmée de type II par analogie avec l'apoptose ou mort cellulaire programmée de type I (Levine et Klionsky, 2004). Néanmoins, le rôle de l'autophagie dans les cellules de mammifères est controversé. En effet, plusieurs équipes décrivent ce processus comme un programme de mort lorsqu'il est déclenché par des stimuli apoptotiques (Yu *et coll.*, 2004 ; Pattingre *et coll.*, 2005 ; Pyo *et coll.*, 2005). Ainsi, le rôle de l'autophagie paraît dépendre du type du stimulus apoptotique subi par la cellule.

La mort autophagique est caractérisée par l'apparition de nombreuses vacuoles autophagiques dans le cytoplasme accompagnée d'un gonflement des mitochondries, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Contrairement à l'apoptose, il y a une dégradation précoce des organelles avec préservation du cytosquelette. De plus, les stades précoces de l'autophagie présentent le plus souvent une absence d'activité des caspases et de la fragmentation de l'ADN. A la différence de la nécrose et comme l'apoptose, elle n'induit pas de réaction inflammatoire (Levine et Yuan, 2005).

4. INTERCONNEXIONS ENTRE L'AUTOPHAGIE ET L'APOPTOSE

4.1. Interconnexions conceptuelles

Il existe trois types d'interconnexions entre l'autophagie et l'apoptose. Dans une relation de partenariat, autophagie et apoptose coopèrent pour induire la mort cellulaire. Si l'un des programmes est bloqué, par défaut génétique ou inhibition pharmacologique, le deuxième prend la relève pour induire la mort cellulaire. Ils peuvent aussi être stimulés en même temps, dans ce cas l'un prédomine sur l'autre, l'activité du premier cachant celle du deuxième.

Alternativement, la seconde voie de mort est activée si la première présente un défaut. Dans ce cas, la première, tant qu'elle est fonctionnelle, inhibe la seconde.

L'autophagie peut également être un antagoniste de la mort cellulaire par apoptose en induisant la survie cellulaire. Par exemple, dans de nombreux cas de stress du réticulum endoplasmique (RE), l'autophagie maintient la fonction du RE par élimination des protéines agrégées et protéines endommagées, limitant la réponse au stress du RE et donc l'apoptose (Ogata *et coll.*, 2006 ; Ding *et coll.*, 2007).

Cependant, l'autophagie peut également favoriser l'apoptose en participant à certains événements morphologiques et cellulaires, sans pour autant induire la mort cellulaire à elle seule. L'autophagie maintient le niveau d'ATP intracellulaire lors d'une carence nutritive (Inbal *et coll.*, 2002). Cette énergie est nécessaire au bourgeonnement des membranes (blebbing) qui nécessite la contraction d'actinomyosin ATP-dépendante. La formation des corps apoptotiques est également dépendante de l'ATP.

4.2. Interconnexions moléculaires

4.2.1. Bcl-2 et Bcl-xL

Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL sont oncogéniques car elles permettent la prolongation de la survie cellulaire en inhibant l'apoptose. Cependant, ces protéines possèdent des effets antiprolifératifs leur permettant de stimuler la quiescence cellulaire. En effet, Bcl-2 et Bcl-xL promeuvent la phase G₀ du cycle cellulaire en augmentant l'expression de la protéine p27 et provoquent ainsi l'arrêt du cycle (Janumyan *et coll.*, 2003 ; Cheng *et coll.*, 2004). Or, l'autophagie est caractérisée par une diminution de la taille cellulaire et elle est accompagnée par un arrêt du cycle cellulaire en G₀/ G₁. De plus, l'expression de la protéine p27 est suffisante pour induire l'autophagie, suggérant ainsi des relations entre le cycle cellulaire et l'autophagie (Komata *et coll.*, 2003). L'arrêt du cycle est une forme d'autopréservation lorsque la prolifération est indésirable. En effet, cet arrêt peut stimuler l'autophagie *via* l'expression de p27, ce qui assure alors la viabilité cellulaire jusqu'à ce que les conditions deviennent favorables à une nouvelle entrée dans le cycle. Cependant, les fonctions d'arrêt du cycle des protéines Bcl-2 et Bcl-xL sont indépendantes de l'autophagie (Valentin et Yang, 2008). En effet, l'absence de la protéine Atg5 ne diminue pas la survie des cellules lors de l'arrêt du cycle après une carence nutritive ou une inhibition de contact (Valentin et Yang, 2008). Néanmoins, même si l'autophagie régulée par Atg5 n'est pas exigée pour l'arrêt en G₀

dans les systèmes de culture, ces résultats n'excluent pas la possibilité que l'autophagie soit nécessaire à la survie des cellules lors d'une longue période de quiescence.

Les données bibliographiques montrent de nombreuses interactions moléculaires entre l'apoptose et l'autophagie. Par exemple, la protéine autophagique Atg6/Beclin 1 est mutée ou absente dans 40 à 70% des cancers (Yue *et coll.*, 2003). La réintroduction de cette protéine inhibe la croissance et la clonogénicité des cellules cancéreuses. Elle inhibe aussi la tumorigenèse dans les souris « nude », suggérant un rôle suppresseur de tumeurs pour Atg6/Beclin 1 (Liang *et coll.*, 1999). Par ailleurs, Atg6/Beclin 1 interagit avec Bcl-2 et Bcl-xL. Les protéines de la famille de Bcl-2, connues pour participer à la régulation de l'apoptose (développé dans le chapitre B.2.3 de l'introduction), interviennent également dans la régulation de l'autophagie. Mais les fonctions pro- ou anti-autophagiques de ces protéines anti-apoptotiques sont encore débattues.

En 2007, une étude cristallographique de Bcl-xL a permis de confirmer l'existence du domaine BH3 de Atg6/Beclin 1 (Oberstein *et coll.*, 2007). Atg6/Beclin 1 fait donc partie des protéines à domaine BH3 unique (AA 114-123) qui interagit spécifiquement avec les domaines BH1 et BH2 des protéines Bcl-2 et Bcl-xL 9 (Maiuri *et coll.*, 2007 ; Ray *et coll.*, 2000).

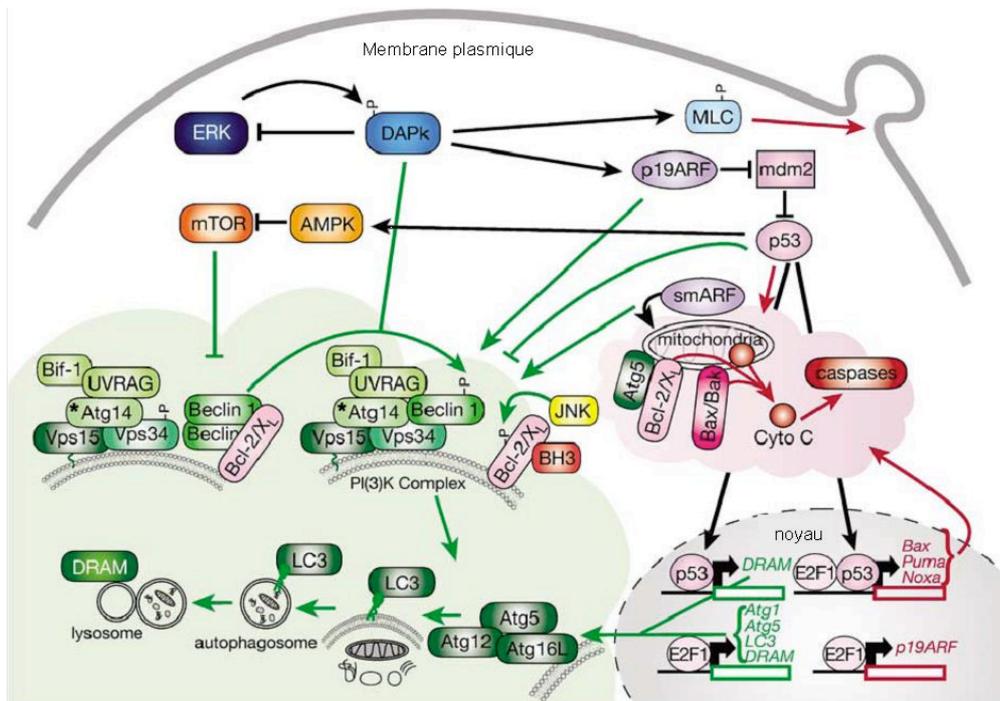


Figure 32 : Interconnexions entre autophagie et apoptose (Eisenberg-Lerner *et coll.*, 2009).

Afin de confirmer cette interaction, l'équipe de Maiuri a utilisé un BH3-mimétique, l'ABT737. L'ajout d'ABT737 libère Atg6/Beclin 1 de Bcl-2 ou Bcl-xL et le complexe Atg6/Beclin 1/hVSP34 peut ainsi être formé et activé (Maiuri *et coll.*, 2007 ; Maiuri *et coll.*, 2007). Il y a alors induction de l'autophagie en conditions physiologiques, de même qu'en milieu carencé dans les cellules cancéreuses HeLa. Cette étude montre également un rôle anti-autophagique des protéines Bcl-2 et Bcl-xL (Figure 32).

L'association constitutive entre Bcl-2, Bcl-xL et Atg6/Beclin 1 peut être perturbée par les signaux stimulant l'autophagie. Par exemple, Atg6/Beclin 1 est phosphorylé par la kinase DAPK (death-associated protein kinase) en son domaine BH3, ce qui diminue son affinité pour Bcl-xL (Zalckvar *et coll.*, 2009). De la même manière, JNK phosphoryle Bcl-2 ce qui permet la libération de Atg6/Beclin 1 après une carence nutritive ou une induction par les céramides (Wei *et coll.*, 2008) (Figure 33). De plus, l'inhibition des protéines de la famille Bcl-2 augmente la létalité du double traitement Sorafenib-inhibiteur des histones désacétylases (Martin *et coll.*, 2009). En effet, ce traitement stimule l'autophagie et surmonte le blocage de la voie extrinsèque facilitant ainsi la mort cellulaire lorsque les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont inhibées (Martin *et coll.*, 2009).

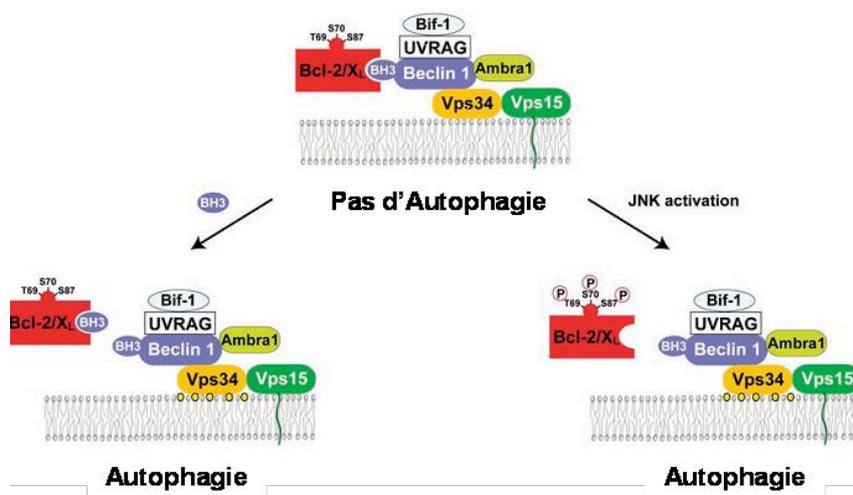


Figure 33 : Régulation de Beclin par les protéines de la famille de Bcl-2 (Levine & Kroemer, 2008).

Le rôle fonctionnel des interactions entre Atg6/Beclin 1 et Bcl-2 ou Bcl-xL est encore largement débattu et semble différent selon le stress utilisé (stimulus apoptotique ou carence nutritive) et la sensibilité des cellules à l'apoptose. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier clairement tous les partenaires et leur rôle respectif selon le stress impliqué.

En effet, l'équipe de Tsujimoto suggère que Bcl-xL influence la formation des autophagosomes en partie par la régulation de Atg6/Beclin 1 (Shimizu *et coll.*, 2004). Pour ce qui est de Bcl-2, sa capacité à interagir avec Atg6/Beclin 1 a été confirmée dans les cellules mammifères (Patingre *et coll.*, 2005 ; Zeng *et coll.*, 2006). L'équipe de Tsujimoto propose un rôle pro-autophagique pour Bcl-2 lors d'un traitement apoptotique des cellules (Shimizu *et coll.*, 2004). A l'inverse, l'équipe de Levine suggère un rôle inhibiteur de Bcl-2 pour l'autophagie (Figure 33). Dans ce cas, Bcl-2 bloque la formation du complexe Atg6/Beclin 1/hVps34 lors d'une carence nutritive (Patingre *et coll.*, 2005). Le rôle de Bcl-2 pour la régulation de l'autophagie dépend du stimulus provoquant l'autophagie et du type cellulaire étudié. La compétence des cellules pour déclencher l'apoptose semble aussi orienter la fonction autophagique de Bcl-2.

4.2.2. BNIP3

Une autre protéine pro-apoptotique appartenant à la famille de Bcl-2 intervient dans l'autophagie. BNIP3 possède un domaine BH3 unique et atypique qui ne peut interagir avec les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Cependant, BNIP3 a été identifiée par

double hybride comme pouvant interagir avec Bcl-2. Ce sont les domaines transmembranaires et N-terminal (acides aminés 1-49) de BNIP3 qui permettent son hétérodimérisation avec les protéines Bcl-2 et Bcl-xL (Ray *et coll.*, 2000).

BNIP3 est une protéine à localisation préférentiellement mitochondriale *via* son domaine transmembranaire en C-terminal. Ce domaine apparait essentiel à la mort par apoptose car la délétion de ce dernier affecte la mort cellulaire. Le remplacement de son domaine TM par celui du cytochrome b5 empêche la localisation mitochondriale de BNIP3. Cependant, il n'inhibe pas la fonction de régulation de l'apoptose par BNIP3 *via* ses interactions avec Bcl-2/Bcl-xL (Ray *et coll.*, 2000). Par ailleurs, un traitement aux céramides ou à l'arsenic induit une mort cellulaire non apoptotique présentant des caractéristiques autophagiques dans les cellules cancéreuses gliales. Les céramides et l'arsenic induisent l'augmentation de l'expression de BNIP3, ce qui provoque un dysfonctionnement mitochondrial. De plus, la surexpression de BNIP3 dans ces cellules est suffisante à provoquer l'autophagie (Kothari *et coll.*, 2003 ; Daido *et coll.*, 2004 ; Kanzawa *et coll.*, 2005). BNIP3 est également une cible transcriptionnelle du facteur HIF-1 α et elle est impliquée dans le déroulement de l'autophagie. Lors d'un stress hypoxique, BNIP3 et BNIP3L s'hétérodimérisent avec Bcl-2 et Bcl-xL, ce qui libère Atg6/Beclin 1 de ces complexes et initie l'autophagie (Bellot *et coll.*, 2009).

4.2.3. Atg5

D'autres protéines autophagiques ont été décrites comme pouvant interagir avec des protéines apoptotiques. C'est le cas de la protéine Atg5, protéine essentielle dans la formation de la membrane pré-autophagosomale (développé dans le chapitre B.3.2 de l'introduction) qui a été récemment identifiée comme pouvant être impliquée dans l'apoptose (cf. Figure 34). La protéine Atg5 peut interagir avec la molécule adaptatrice FADD qui intervient dans la voie extrinsèque de l'apoptose. Son rôle est essentiel à la mort autophagique induite par l'interféron γ (Pyo *et coll.*, 2005).

Par ailleurs, Atg5 peut être clivé en C-terminal par la Calpaïne (Yousefi *et coll.*, 2006). Le fragment d'Atg5 tronqué transloque alors jusqu'à la mitochondrie où elle recrute Bcl-xL. Cette hétérodimérisation Atg5/Bcl-xL libère et active Bax. Cette protéine pro-apoptotique s'insère alors dans la membrane externe de la mitochondrie et permet ainsi la libération de cytochrome c ainsi que l'activation des Caspases favorisant ainsi l'apoptose (Yousefi *et coll.*,

2006 ; Codogno et Meijer, 2006). Dans ce cas, la protéine Atg5 tronquée agit de façon semblable à un membre pro-apoptotique.

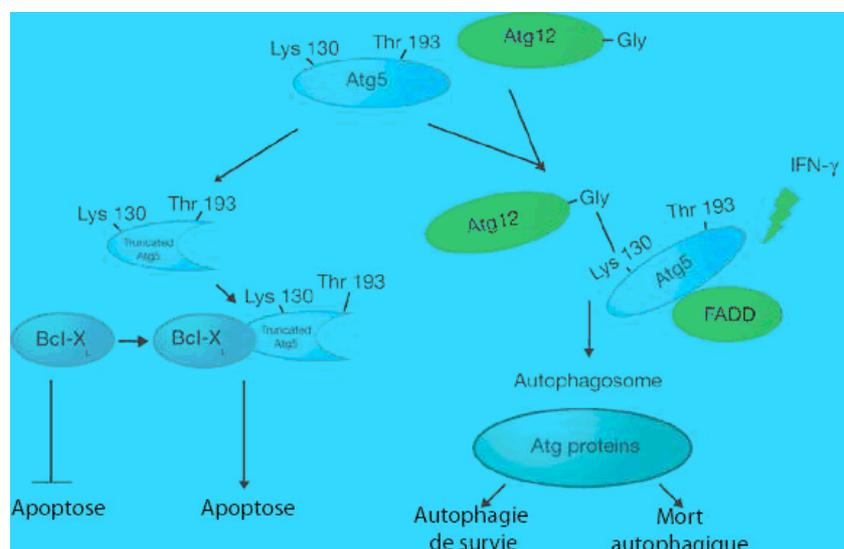


Figure 34 : Rôles d'ATG5 dans l'autophagie et l'apoptose (Codogno et Meijer, 2006).

5. ROLES NON-APOPTOTIQUES DES CASPASES

Outre leur implication essentielle dans l'induction de la mort cellulaire programmée, de plus en plus d'exemples tendent à prouver que l'activation des Caspases ne conduit pas systématiquement à la mort cellulaire. Les Caspases peuvent ainsi être impliquées dans des processus divers et indépendants de l'apoptose tels que le processus inflammatoire, la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire. Dans ce cas, les fonctions non-apoptotiques des Caspases provoquent le clivage spécifique d'autres substrats membres de différentes familles protéiques telles que les cytokines, les kinases, les facteurs de transcription et les polymérases (Figure 35 et tableau 3).

De nombreux mécanismes régulent ces clivages, comme des modifications post-traductionnelles des Caspases ou de leurs substrats. Le clivage est aussi dépend de la localisation subcellulaire des Caspases comme la présence de la Caspase-3 au niveau de la mitochondrie, la Caspase-8 au niveau nucléaire ainsi que la Procaspase-2 présente au niveau de l'appareil de Golgi. La protection des protéines cibles par des molécules « chaperonnes » et l'activation de protéines anti-apoptotiques [pour revue, Launay 2005] régulent également le clivage des substrats des Caspases.

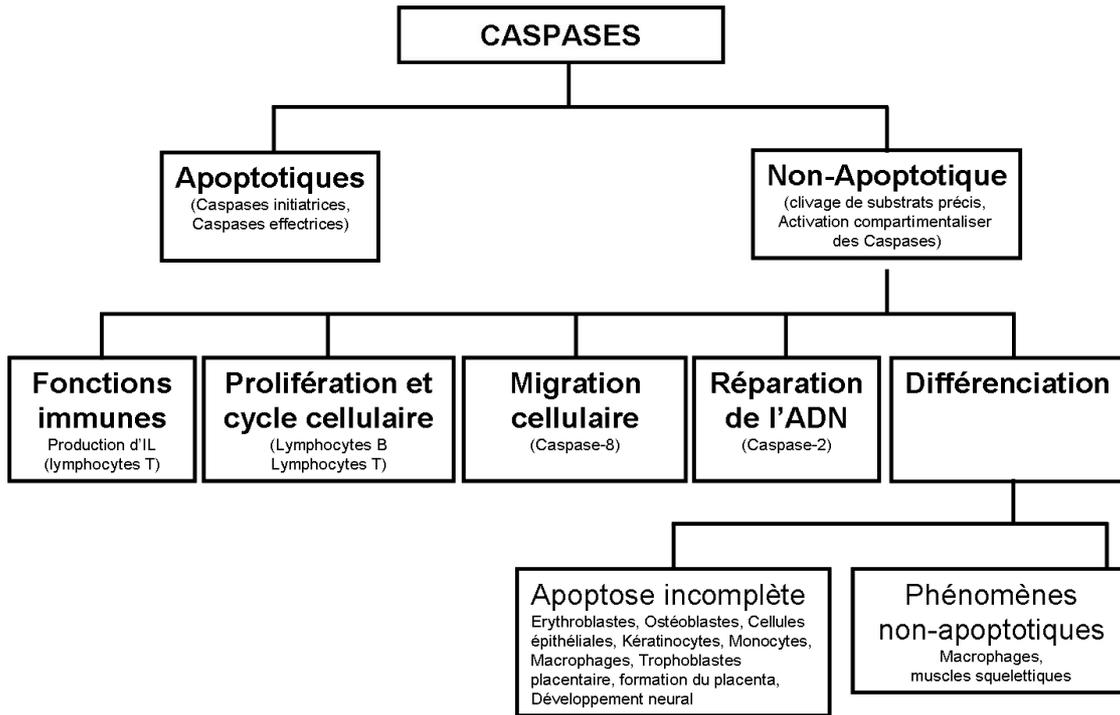


Figure 35 : Diagramme schématisque des fonctions des Caspases.

5.1. Le processus inflammatoire

La Caspase-1 (ICE) est identifiée comme étant l'unique protéase à cystéine impliquée dans la maturation des interleukines (IL) comme la pro-interleukine-1 β en IL-1 β (Thornberry *et coll.*, 1992 ; Cerretti *et coll.*, 1992). L'activation de la Caspase-1 provoque la sécrétion de l'IL-1 β par les macrophages en réponse à différentes infections bactériennes, virales ou molécules endogènes libérées lors de dommages cellulaires par les macrophages (Wang *et coll.*, 1998 ; Nadiri *et coll.*, 2006). La Caspase-1 est aussi impliquée dans la sécrétion des IL-18 et IL-33 en réponse à une inflammation ou une réponse immunitaire innée en formant un complexe actif nommé « l'inflammasome » (Nadiri *et coll.*, 2006). L'activation de la Caspase-1 par l'inflammasome est également nécessaire à la protection de cellules lésées. En effet, la Caspase-1 stimule le métabolisme lipidique par l'activation des SREBPs (sterol regulatory element binding proteins) afin de réparer les dommages membranaires causés par des toxines et permet aussi la protection de ces cellules contre l'attaque de pathogènes (Gurcel *et coll.*, 2006).

Processus cellulaire	Substrats	Fonction
Régulation du cycle cellulaire	Kinase Wee1	Inactive
	P21 ^{Waf1}	Inactive
	P27 ^{KIP1}	Inactive
	NF-AT	Inactive
	SATB1	Inactivé

Maturation des cytokines	IL-1 β IL-18	Activé Activé
Activation du NF- κ B	PARP-1	Activé
Activation des cellules T et B	c-FLIP Lamin B PARP-1 Kinase Wee1	Activé inconnu Activé Inactivé
Différenciation des macrophages	PAK-2 A-tubuline Vinculine Nucleophosmine PAI-2 hnRNP-H hnRNP-C1/C2	Activé Inactivé inconnu inconnu Inactivé inconnu inconnu
Expression du CMH-II et maturation des cellules dendritiques	β 1-adaptin γ -adaptin	Inactivé Inactivé
Différenciation des érythroblastes	PARP-1 Lamine B Acinus	Inactivé Inactivé Activé
Différenciation myoblastique	Kinase MST1 Calpastatin	Activé Inactivé
Formation des fibres du cristallin	PARP-1	Inactivé
Différenciation des kératinocytes	PKC δ	Activé

Tableau 3 : Substrats des Caspases dans des conditions non apoptotiques (Lamkanfi *et coll.*, 2006).

La Caspase-11 est également impliquée dans la maturation des pro-IL-1 β en IL-1 β chez la souris. En effet, cette Caspase est essentielle à l'activation de la Caspase-1 (Wang *et coll.*, 1998).

Les Caspases-1 et -3 sont également impliquées dans la production et la maturation de l'IL-18 dans les cellules monocytaire THP1 (Akita *et coll.*, 1997). De plus, le clivage de l'IL-18 par la Caspase-1 provoque la production d'IFN- γ (Ghayur *et coll.*, 1997). La Caspase-3 est aussi impliquée dans le clivage de la pro-IL-16 induisant ainsi le chimiotactisme des cellules T au cours d'une inflammation (Zang 1998).

Au contraire, la Procaspase-12 diminue la réponse immunitaire induite par des endotoxines, en jouant un rôle de dominant-négatif de l'IL-1 et des voies de signalisation NF- κ B (Saleh *et coll.*, 2004).

5.2. La prolifération et le cycle cellulaire

Les Caspases sont également impliquées dans la prolifération cellulaire *via* différentes voies de signalisation. Un grand nombre d'études montre le rôle essentiel de la Caspase-8 dans la prolifération des cellules immunes ou lymphocytes (Chung *et coll.*, 2002 ; Salmena *et coll.*, 2003 ; Beisner *et coll.*, 2005 ; Su *et coll.*, 2005). Des patients avec des mutations homozygotes pour la Caspase-8 présentent des défauts d'activation de leurs lymphocytes T, lymphocytes B et cellules « Natural killer ». Ces patients succombent souvent à des infections

bactériennes à cause de leur incapacité à activer leurs cellules immunitaires (Chung *et coll.*, 2002). Des souris avec des cellules T dépourvues de Caspase-8 développent des lymphoadénopathies et des splénomégalies, car elles ne peuvent plus réguler l'homéostasie lymphocytaire (Salmena *et coll.*, 2003). L'activité de la Caspase-8 durant la prolifération et de l'activation des cellules T et B résulte du clivage d'un nombre restreint de substrats dont la kinase Wee1 (Alam *et coll.*, 1999), PARP-1 et la lamine B (Beisner *et coll.*, 2005). Le clivage de Wee1 prévient la phosphorylation de la Cdc2, kinase régulant le cycle cellulaire, et inhibe ainsi la progression du cycle cellulaire (Castedo *et coll.*, 2002). Cependant, la Caspase-8 peut également activer NF- κ B et stimuler la prolifération des cellules B (Su *et coll.*, 2005).

La Caspase-3 est aussi impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire des lymphocytes B. Ce rôle est suggéré par la localisation subcellulaire de la Caspase-3 et la protéolyse des substrats associés à la régulation du cycle cellulaire de ces cellules. Dans les cellules lymphoïdes proliférantes, la Caspase-3 clive la protéine P27^{KIP1}, inhibiteur des CDK (cyclin-dépendante kinase), contribuant ainsi à la progression du cycle (Eymin *et coll.*, 1999 ; Frost *et coll.*, 2001 ; Frost *et coll.*, 2001). De même, la Caspase-3 peut inhiber le cycle cellulaire par un clivage en C-terminal de la protéine p21^{Waf1} (CDK inhibitor) au niveau de son domaine de liaison avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen). En effet, l'interaction de p21^{Waf1} avec le PCNA, cofacteur de la DNA polymérase δ , au niveau de ce domaine de liaison stimule le cycle cellulaire en phase S (Park *et coll.*, 1998 ; Zhang *et coll.*, 1999).

Contrairement au rôle positif de la Caspase-3 sur la prolifération des lymphocytes B, après stimulation de la Caspase-6, les cellules B rentrent en quiescence au niveau de la phase G1. L'une des cibles de la Caspase-6 dans ce processus est le suppresseur transcriptionnel spécial « AT-rich sequence-binding protein 1 » (Olson *et coll.*, 2003).

5.3. La migration cellulaire

Les Caspases sont impliquées dans la maintenance de l'intégrité du cytosquelette et dans la régulation de la migration cellulaire. En effet, durant l'apoptose, les Caspases clivent les protéines impliquées dans l'adhésion et la mobilité cellulaire (voir 2. 4. 4 Substrats des Caspases) (Fischer *et coll.*, 2003). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs inhibe la mobilité des cellules sur des plaques cotées au collagène sans pour autant affecter la prolifération et la viabilité cellulaire. Une activité Caspase-3 est détectée dans les cellules adhérentes à l'inverse

des cellules en suspension. Toutefois, des inhibiteurs plus spécifiques des Caspases n'inhibent pas la mobilité cellulaire dans ce modèle (Watanabe et Akaike, 1999).

Plus récemment, l'analyse de lignées tumorales CD95-résistantes suggère également un rôle des Caspases dans la migration cellulaire. En effet, un grand nombre de ces cellules répondent à une stimulation au CD95 par une augmentation de la mobilité et du potentiel d'invasion sur une membrane de Matrigel. L'activation de la Caspase-8 facilite la migration de ces cellules tumorales après une stimulation au CD95 en aval et/ou en parallèle de l'activation transcriptionnelle induite par le NF- κ B (Barnhart *et coll.*, 2004).

Chez la drosophile, l'inhibition de DRONC (homologue de la Caspase-9) par DIAP est essentielle à la migration des cellules « border » pour permettre la formation des ovaires (Geisbrecht et Montell, 2004).

5.4. La réparation des dommages à l'ADN

La Caspase-2 est la seule Caspase nucléaire qui soit directement activée par des dommages à l'ADN. De nombreuses données suggèrent que la Caspase-2 est impliquée dans la réparation de l'ADN. En effet, des souris Caspase-2^{-/-} vieillissent prématurément, phénotype associé à un défaut de réparation à l'ADN (Zhang *et coll.*, 2007).

5.5. La différenciation.

5.5.1. Différenciation avec énucléation

Le processus d'enucléation, au cours de la différenciation, est souvent comparé à un processus d'apoptose incomplète (Counis *et coll.*, 1998 ; Bozanić *et coll.*, 2003) ou à une forme spécialisée de mort cellulaire programmée dans laquelle les corps apoptotiques sont fonctionnels et non phagocytés. Les meilleurs exemples sont le processus d'enucléation au cours de la différenciation des fibres cristallines, des érythrocytes, des kératinocytes et la formation des plaquettes. Au cours de ce mécanisme, les Caspases exécutrices (-6 ou -7) sont augmentées (Dahm, 1999 ; De Botton *et coll.*, 2002 ; Lamkanfi *et coll.*, 2006). Les Caspases-2, -3 et -9 sont transitoirement activées pendant ces processus. Cette augmentation d'activité permet le clivage des protéines impliquées dans l'intégrité nucléaire (Lamine B) et la condensation de la chromatine (acinus) (Zermati *et coll.*, 2001).

5.5.1.1. Maturation érythropoïétique

L'érythropoïèse est déclenchée par l'hormone érythropoïétine (Epo). Elle permet la maturation des proérythroblastes en érythroblastes basophiles, polychromatophiles, acidophiles puis en réticulocytes au niveau de la moelle osseuse. Ces cellules éliminent alors leur noyau et entrent dans la circulation sanguine comme érythrocytes (globules rouges). La différenciation terminale est caractérisée par une réduction progressive du volume cellulaire et une condensation du noyau et de la chromatine des réticulocytes. L'énucléation s'effectue ensuite au sein d'îlots érythroblastiques constitués d'un macrophage central étroitement associé par des molécules d'adhérence aux érythroblastes en cours de maturation. La membrane de l'érythroblaste perd progressivement son affinité pour le macrophage alors que le noyau reste fixé, ce qui permet l'énucléation et la phagocytose du noyau par le macrophage. Le processus d'énucléation augmente l'expression de p53 dans les cellules érythroïdes (Peller *et coll.*, 2003) et de la DNase II α dans les macrophages (Kawane *et coll.*, 2001). Les réticulocytes ainsi formés vont compléter leur maturation en perdant leurs organelles et en remodelant leur membrane (Morioka *et coll.*, 1998).

Ces changements morphologiques présentent certaines similitudes avec ceux observés dans les cellules en cours d'apoptose. L'équipe d'Hermine a donc étudié l'activation des Caspases au cours de la différenciation érythropoïétique induite par l'Epo. Ainsi, cette équipe montre que les Caspases-2, -3 et -9 sont transitoirement activées au cours de ce mécanisme. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de Caspases est capable de ralentir la différenciation en empêchant la condensation de la chromatine et du noyau (Zermati *et coll.*, 2001). Une approche ARN interférence a confirmé l'implication et la nécessité de la Caspase-3 au cours de la maturation érythroïde. En effet, la suppression de cette caspase bloque la transition entre les proérythroblastes et les basophiles (Carlile *et coll.*, 2004).

Cependant, contrairement à ce qui se produit au cours de l'apoptose (De Maria *et coll.*, 1999), le facteur de transcription GATA-1 n'est pas clivé par la Caspase-3 au cours de la différenciation érythropoïétique (Zermati *et coll.*, 2007). Dans ce contexte, la protéine de choc thermique Hsp70 est exprimée de façon constitutive et se localise dans le noyau où elle interagit avec GATA-1. A ce niveau, elle protège ce facteur du clivage par la Caspase-3 (Figure 36a) (Ribeil *et coll.*, 2005). En accord avec le rôle d'Hsp70 comme protéine protectrice de GATA-1, le sevrage en Epo, qui induit l'apoptose des réticulocytes, se traduit

par une sortie nucléaire de Hsp70. La Caspase-3 clive alors GATA-1 et induit ainsi une augmentation de l'activité des Caspases et l'apoptose (Figure 36b).

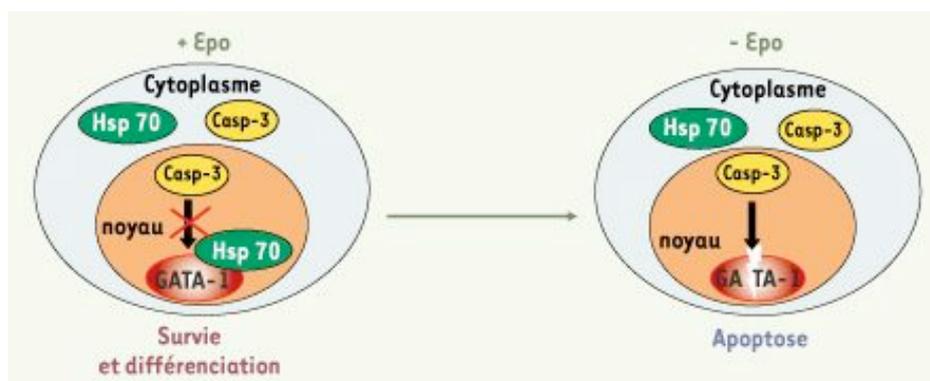


Figure 36 : Modèle de la protection de GATA-1 du clivage par la Caspase-3 par Hsp70 au cours de la différenciation érythroblastique (D'après Vandekerckhove *et coll.*, 2008)

(a) L'Epo permet le maintien de la localisation nucléaire d'Hsp70, ce qui protège GATA-1 du clivage par la Caspase-3. (b) En l'absence d'Epo, Hsp70 est délocalisée vers le cytoplasme et la Caspase-3 peut alors cliver GATA-1, ce qui entraîne l'arrêt de différenciation et l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques.

Ainsi, l'hormone érythropoïétine (Epo) protège les cellules érythroïdes en cours de différenciation, elle empêche le clivage de GATA-1 par la Caspase-3 en maintenant Hsp70 au niveau nucléaire (Ribeil *et coll.*, 2005).

5.5.1.2. Différenciation terminale des fibres cristallines

L'implication des Caspases-3 et -6 dans un processus de différenciation est observée pour la première fois au cours de la différenciation terminale des fibres cristallines (Ishizaki *et coll.*, 1998). La fonction des fibres matures nécessite leur énucléation et la suppression des organelles cellulaires. En effet, le centre du cristallin doit être transparent. Des déficiences au niveau de l'énucléation provoquent des cataractes congénitales, due à une mauvaise organisation des fibres du cristallin et à la réflexion de la lumière par les organelles (Dahm *et coll.*, 1998). Des souris transgéniques surexprimant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 montrent également des troubles du développement du cristallin, dont la présence de noyaux intacts ou légèrement fragmentés (Fromm et Overbeek, 1997). En effet, Bcl-2 inhibe l'activation des Caspases par son rôle anti-apoptotique.

Des cellules de l'épithélium antérieur de rat sont cultivées *in vitro* en présence de fibres du cristallin différenciées. Ces cocultures sont alors exposées au bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et à l'insuline. Il y a alors formation de corps lentoides associée au clivage de PARP et la fragmentation de l'ADN. Ce processus est complètement aboli en présence d'inhibiteurs

de Caspases comme le z-VAD-fmk (Ishizaki *et coll.*, 1998 ; Wride *et coll.*, 1999 ; Sanders et Parker, 2003). La Caspase-6 est également activée au cours de la période où les organelles sont éliminées, soit 2 ou 3 jours avant l'énucléation (Foley *et coll.*, 2004).

5.5.1.3. Différenciation terminale des kératinocytes

La différenciation terminale des kératinocytes en cornéocytes est nécessaire à la formation d'une barrière protégeant l'organisme contre les influences externes et la perte d'eau. Cette différenciation est également associée à une énucléation et à l'activation transitoire des Caspases (Weil *et coll.*, 1999). Dans les kératinocytes différenciés, l'activation des Caspases est associée à une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale et une libération progressive de cytochrome c (Allombert-Blaise 2003). La Caspase-14 est exprimée dans des tissus spécifiques et plus essentiellement dans les kératinocytes, ce qui en fait la principale Caspase activée au cours de la différenciation de ces cellules (Rendl *et coll.*, 2002).

La Caspase-3 est également nécessaire à l'initiation de cette différenciation terminale. Des souris déficientes en Caspase-3 montrent une augmentation de la prolifération et une diminution de la différenciation des kératinocytes intrafolliculaires embryonnaires (Okuyama *et coll.*, 2004). Durant la différenciation embryonnaire des kératinocytes, Notch-1 est activé et sa voie de signalisation induit l'expression de la Caspase-3. Cependant, son expression et son activation ne sont pas suffisante pour déclencher l'apoptose. Néanmoins, la Caspase-3 active la kinase C- δ (PKC δ). Cette protéine est un régulateur positif de la différenciation des kératinocytes (Fernando *et coll.*, 2002).

5.5.2. Différenciation sans énucléation

L'activation des Caspases est également nécessaire à la différenciation de certains types cellulaires nucléés. L'un des mieux étudiés est la différenciation du muscle squelettique.

5.5.2.1. Formation des muscles squelettiques

Au cours de la formation du muscle squelettique, les myoblastes se différencient et fusionnent en fibres multinucléées. Cette fusion nécessite une dégradation limitée des protéines membranaires (Wakelam, 1985 ; Fulton *et coll.*, 1981).

Des souris déficientes en Caspase-3 sont viables quelques jours. Cependant, ces souris présentent une masse musculaire squelettique très inférieure aux souris témoins. En effet, des

cultures primaires de myoblastes démontrent que la déplétion du gène *CASP-3* altère *in vitro* la formation des myotubes. De façon intéressante, l'expression de la Caspase-3 dans une population confluente de myoblastes initie le programme de différenciation sans induire de mortalité cellulaire. Au cours de la différenciation myoblastique, la Caspase-3 active la kinase sérine/thréonine MST1 (Mammalian Steril Twenty-like kinase). Cependant, la Caspase-3 n'est pas essentielle à la myogenèse car des cellules déficientes expriment de la MST1 active au cours de ce processus (Fernando *et coll.*, 2002). De plus, la voie de signalisation de Raf régule négativement la Caspase-3 au cours de la myogenèse, régulation également décrite au cours de l'érythropoïèse (DeChant *et coll.*, 2002).

Plus récemment, l'équipe de Barnoy a mis en évidence que la Caspase-1 est nécessaire à la fusion des myoblastes en myotubes multinucléés chez le rat. Cet effet est relié à la dégradation de la Calpastatine (Barnoy et Kosower, 2003).

5.5.2.2. La mégacaryocytopoïèse et la formation des plaquettes

La différenciation des mégacaryocytes est induite par la thrombopoïétine. La thrombopoïétine se lie au récepteur MPL (MyeloProliferative Leukemia virus oncogene), stimule la prolifération et initie la polyploïdisation et la maturation des mégacaryocytes. De façon intéressante, la sérine/thréonine kinase MST1 peut être également activée par les ligands de Mpl. Dans ce cas, MST1 participe aux voies de signalisation de Mpl et potentialise ainsi la polyploïdisation et la différenciation des mégacaryocytes (Sun et Ravid, 1999). De plus, MST1 est connue comme substrat des Caspases. En effet, cette protéine est clivée par les Caspases dans les lymphocytes B apoptotiques (Graves *et coll.*, 1998). De plus, ce clivage augmente au cours de la différenciation myoblastique (Fernando *et coll.*, 2002). Le clivage de MST1 par les Caspases est nécessaire à sa fonction dans la mégacaryocytopoïèse.

Une autre fonction des Caspases dans la mégacaryocytopoïèse est la formation des proplaquettes, issues de la fragmentation du noyau et du cytoplasme des mégacaryocytes matures. Ce mécanisme est régulé par l'activation de caspases, en particulier par les Caspases -3 et -9. En effet, la surexpression de *Bcl-2* ou l'addition d'inhibiteurs des Caspases, en particulier de la Caspase-3 et de la Caspase-9, inhibent la formation des plaquettes (De Botton *et coll.*, 2002). Dans les mégacaryocytes matures, la Caspase-3 est activée et clive certains de ses substrats. Cette activation de la Caspase-3 est très particulière car elle est

compartimentalisée dans le cytoplasme du mégacaryocyte. En revanche, quand le mégacaryocyte est apoptotique, cette activation est diffuse dans le cytosol. Ces résultats indiquent que le clivage de certains substrats des caspases est absolument nécessaire à la formation des plaquettes (De Botton *et coll.*, 2002).

Les Caspases jouent également un rôle dans l'activation des plaquettes. En effet, les inhibiteurs de Caspases empêchent l'agrégation des plaquettes induite par l'ADP (Adenosine DiPhosphate) (Cohen *et coll.*, 2004).

5.5.2.3. Différenciation des monocytes en macrophages

La différenciation des monocytes en macrophages est induite par le facteur M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor). Ce facteur clive la protéine RIP (Receptor-Interacting Protein), kinase possédant un domaine de mort et régulant NF- κ B. La Caspase-8 est activée au cours de la différenciation en macrophage où elle est responsable de la régulation inverse de NF- κ B (Rébé *et coll.*, 2007). L'inhibition des Caspases empêche cette différenciation (Sordet *et coll.*, 2002). De plus, l'extinction conditionnelle de la Caspase-8 dans les cellules de moelle osseuse prévient la différenciation des lignées myélomonocytaires en macrophages (Kang *et coll.*, 2004).

5.5.2.4. Différenciation neurale

Dans le système nerveux central (SNC), la Caspase-3 est activée mais n'est pas apoptotique. Elle est localisée dans les cellules neurales proliférantes. Elle est également exprimée au cours du développement du cortex cérébral, au niveau de la zone ventriculaire (Yan *et coll.*, 2001) et la couche granulaire externe du cervelet (Oomman *et coll.*, 2004).

Au cours de la période prénatale, les cellules gliales radiaires sont remplacées par des cellules différenciées, les astrocytes multipolaires et les oligodendrocytes. Cependant, dans des régions plus spécifiques, ces cellules sont remplacées par des cellules spécialisées comme la « Bergmann glia » (astrocytes protoplasmiques) dans le cervelet et les cellules de Muller au niveau de la rétine (Choi et Lapham, 1980).

La maturation/différenciation de la « Bergmann glia » induit des processus d'extension et de transformation des cellules. Elle est dépendante de facteurs diffusibles comme la neuréguline (Huang et Mei, 2001), les Sonic hedgehog (SHH) (Dahmane et Ruiz i Altaba, 1999), et les contacts de surface entre les cellules neuronales (Hatten, 1987). La différenciation de la

« Bergmann glia » est également influencée par les cellules de Purkinje (Dahmane et Ruiz i Altaba, 1999) et les cellules granulaires (Huang et Mei, 2001). Des expériences *in vitro* montre que la Caspase-3 est nécessaire à la différenciation de la « Bergmann glia (Oomman *et coll.*, 2006). De plus, l'inhibition de la Caspase-3 altère le développement de la « Bergmann glia », impliquant une fonction de cette protéase dans la modulation phénotypique de ces cellules.

La Caspase-3 est également impliquée dans la maturation des neurones pyramidaux de l'hippocampe. En effet, l'activation localisée de la Caspase-3 dans les dendrites de ces neurones module leur potentialisation à long terme et change la plasticité de leurs synapses (Kudriashov *et coll.*, 2003).

De plus, l'activité de la Caspase-3 augmente transitoirement au cours de la différenciation des neurosphères ou des PC12 (Rohn *et coll.*, 2004 ; Fernando *et coll.*, 2005). L'administration d'un inhibiteur spécifique de la Caspase-3 prévient alors ce processus de différenciation neural. L'activité de la Caspase-1 augmente également au cours de la différenciation des cellules PC12 (Fernando *et coll.*, 2005).

5.5.2.5. Différenciation des spermatozoïdes

Chez la *Drosophila melanogaster*, les Caspases augmentent au cours de la différenciation des spermatozoïdes. Chez les mâles, de nombreuses protéines de l'apoptose jouent un rôle dans l'individualisation des spermatides, incluant de nombreuses Caspases, dFADD, ARK (homologue de l'APAF1 humain) et un des deux gènes du cytochrome c, *CYT-C-D* (Arama *et coll.*, 2003 ; Huh *et coll.*, 2004). Un complexe semblable à l'apoptosome semble être assemblé pour activer les Caspases et supprimer le volume cytoplasmique des spermatides (Arama *et coll.*, 2003). L'activation des Caspases pendant la différenciation des spermatozoïdes pourrait être due au cytochrome-c-d de cet animal. Les organelles et plus particulièrement le noyau sont protégés contre le potentiel léthal des Caspases activées au cours de la différenciation. La protéine dBRUCE, homologue chez la drosophile de l'Apollon humain et codant pour une enzyme E2-like, exerce cette fonction dans les compartiments cellulaire spécifiques (Arama *et coll.*, 2003).

5.5.2.6. Différenciation des cellules ostéoblastiques

L'activation de Caspase est impliquée dans la différenciation des lignées cellulaires ostéoblastiques exposées à la protéine BMP4 (Bone Morphologic Protein). En effet, l'équipe de Mogi observe une activation transitoire des Caspases-8, -2 et -3 après un traitement au BMP4. De plus, cette protéine induit une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline et l'expression des protéines expression de l'ostéocalcine et de Cbfa1, marqueurs de différenciation ostéogénique (Mogi et Togari, 2003) .

Dans les souris déficientes en Caspase-3, la différenciation ostéogénique des cellules souches de la moelle osseuse est atténuée, ce qui se traduit par un défaut d'ossification et une diminution de la densité de la minéralisation osseuse (Miura *et coll.*, 2004). De plus, la déficience en Caspase-3 entraîne une diminution de l'expression des protéines Cdk2 et Cdc2 ainsi qu'une augmentation de p21 et p27, ce qui se traduit par un arrêt du cycle cellulaire (Miura *et coll.*, 2004).

PROJET

PROJET DE THESE

Depuis très récemment, la recherche contre le cancer se concentre sur la ou les cellules à l'origine des tumeurs. En effet, certains travaux suggèrent que des mutations de multiples gènes, au sein même des tumeurs, transforment des cellules souches adultes en cellules souches cancéreuses, ou CSCs (Singh *et coll.*, 2004 ; Shiras *et coll.*, 2007). Ces cellules constitueraient alors des progéniteurs tumoraux (Bao *et coll.*, 2006). Cependant, la notion de cellule souche cancéreuse reste encore très controversée.

Par ailleurs, le marqueur de cellules souches neurales CD133 a récemment été décrit comme marqueur des CSCs neurales. En effet, plusieurs équipes ont mis en évidence que certaines cellules de tumeurs cérébrales exprimaient ce marqueur et qu'une fois isolées, les cellules neurales CD133⁺ étaient capables de générer une tumeur avec une efficacité supérieure à celle des cellules tumorales non sélectionnées (Uchida *et coll.*, 2000 ; Singh *et coll.*, 2003 ; Singh *et coll.*, 2004 ; Galli *et coll.*, 2004). Cependant, l'expression du marqueur CD133 ne semble pas être spécifique des CSCs car elle a été très rapidement contredite. En effet, des travaux plus récents décrivent que des cellules CD133⁻ sont également capable de générer des tumeurs (Beier *et coll.*, 2007 ; Joo *et coll.*, 2008 ; Wang *et coll.*, 2008). Par ailleurs, il a été observé que les CSCs neurales pouvaient résister à la plupart des thérapies anticancéreuses car elles se divisent rarement. De plus, elles présentent de nombreux mécanismes de chimiorésistance [pour revue, Das *et coll.*, 2008] . Or, les thérapies actuelles éliminent principalement les

cellules proliférantes de la masse tumorale et non les progéniteurs tumoraux. Par conséquent, pour une guérison durable du cancer, il serait judicieux d'éliminer les cellules souches cancéreuses. Pour cela, il faut comprendre comment les CSCs résistent aux traitements anticancéreux et comment les sensibiliser à ces traitements.

Il existe de nombreuses similitudes entre les cellules souches et les cellules souches cancéreuses. Elles sont capables d'autorenouvellement et de s'engager dans plusieurs voies de différenciation [pour revue, Ailles et Weissman, 2007]. Notre objectif a donc été, dans un premier temps, de caractériser les mécanismes de mort cellulaire, l'apoptose et l'autophagie, dans les cellules souches.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont des cellules médullaires multipotentes pouvant générer des cellules stromales, adipocytaires, chondrogéniques et ostéoblastiques (Pittenger *et coll.*, 1999), neurales et astrocytaires (Kopen *et coll.*, 1999 ; Woodbury *et coll.*, 2000). Les CSMs possèdent une capacité migratoire importante. Ces cellules sont présentes dans la moelle osseuse au sein de microenvironnements protecteurs appelés « niches ».

Les hCSMs sont insensibles aux stimuli apoptotiques. Cependant, les hCSMs deviennent sensible à l'apoptose dès qu'elles sont engagées vers une voie de différenciation, que ce soit ostéogénique, adipocytaire ou neurale. Dans un premier temps, nous avons donc étudié les mécanismes de mort cellulaire de type I, l'apoptose, et de différenciation des CSMs afin de comprendre comment ces cellules acquièrent une sensibilité à l'apoptose au cours de leur différenciation. En effet, la Caspase-3 semble impliquée dans la différenciation des hCSMs. Or cette protéine est tout d'abord une enzyme apoptotique. Nous cherchons donc à déterminer le moment où la Caspase-3 passe d'une fonction de différenciation à une fonction de mort cellulaire. De très récents travaux sont venus conforter notre hypothèse de sensibilisation apoptotique par différenciation cellulaire. En effet, les équipes de Weinberg et de Lander ont induit une différenciation épithéliale des CSCs par traitement à la salinomycine. Ainsi, la salinomycine éradique les cellules possédant les propriétés des CSCs des tumeurs mammaires (Gupta *et coll.*, 2009). Les auteurs proposent alors d'éliminer les CSCs mammaires en combinant différenciation et traitements anti-cancéreux (Gupta *et coll.*, 2009).

En parallèle de l'apoptose, nous avons étudié un autre mécanisme de mort cellulaire, l'autophagie, dans les CSMs. En effet, l'autophagie est décrite comme étant soit un mécanisme de mort cellulaire de type II (Yu *et coll.*, 2004 ; Pattingre *et coll.*, 2005 ; Pyo *et coll.*, 2005), soit un mécanisme de survie (Boya *et coll.*, 2005 ; Lum *et coll.*, 2005).

Cependant, l'autophagie s'avère être un mécanisme de survie dans les CSMs possédant une activité basale élevée. Nous avons également analysé les capacités autophagiques des CSMs au cours de leur différenciation ostéogénique.

Dans un troisième temps, nous avons étudié les interconnexions possibles entre l'apoptose et la différenciation ostéogénique. En effet, il apparaît que la Caspase-3, facteur clé de la cascade apoptotique, régule également la différenciation ostéogénique (Miura *et coll.*, 2004). Nous nous sommes alors intéressés à l'importance et au rôle de la Caspase-3 au cours de la différenciation. Nous avons également cherché à mettre en évidence les substrats de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique des CSMs, car ces derniers n'ont pas encore été décrits. Pour cela, nous avons utilisé une approche protéomique par analyse en 2D-DIGE couplé à une identification par MALDI-TOF-TOF.

MATERIELS ET METHODES

METHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

1. CULTURE CELLULAIRE

1.1. Cellules souches mésenchymateuses ou CSMs

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont obtenues par ponction au niveau des crêtes iliaques de patients âgés de 30-40 ans. Les ponctions sont réalisées au sein du service Orthopédie du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Les cellules de la moelle osseuse sont diluées dans du milieu Modified Eagle Medium-alpha ou MEM- α (M8042, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), puis déposées sur Ficoll (1,06 mg/mL) et centrifugées à 1500 g pendant 30 minutes (accélération modérée et sans frein). Les cellules mononuclées se trouvent à l'interface du Ficoll. Elles sont prélevées puis lavées en milieu MEM- α . Les

cellules sont ensemencées en flasques de 75 mm² (Nunc, VWR international, SA, France). Après 24h de culture, les cellules en suspension sont éliminées et les cellules adhérentes sont amplifiées.

Les CSMs sont cultivées à 37°C sous 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. Elles sont cultivées dans le milieu MEM- α supplémenté de 20 % de sérum de veau fœtal (SVF) préalablement décomplémenté 30 minutes à 56°C, de 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), de 100 U/mL pénicilline et de 100 μ g/mL streptomycine (Invitrogen). Ce milieu sera ultérieurement appelé MEM- α complet.

Les cellules sont cultivées et utilisées entre le passage 0 et le passage 6. Les cellules sont ensemencées à une densité d'environ 1300 cellules/cm² (confluence de 20 %) et amplifiées jusqu'à une densité d'environ 7000 cellules/cm² (confluence de 80 %).

En parallèle des différents traitements de différenciation, les cellules sont cultivées en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 4500 mg de glucose, supplémenté de 10 % de SVF, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL pénicilline, 100 μ g/mL streptomycine, appelé ultérieurement DMEM complet.

1.1.1. Différenciation ostéogénique

Les cellules sont amplifiées jusqu'à une confluence de 70% dans du milieu MEM- α complet, puis cultivées en présence de milieu PoieticsTM hMSC Osteogenic Differentiation (Lonza, Cambrex BioScience, Verviers, Belgique) pendant 7, 14 ou 21 jours.

1.1.2. Différenciation adipocytaire

Les cellules sont amplifiées jusqu'à une confluence de 70% dans du milieu MEM- α complet, puis cultivées en présence de milieu DMEM 4, 5 g de glucose supplémenté de 100 ng/mL d'insuline pendant 21 jours.

1.1.3. Différenciation chondrogénique

Les CSMs sont ensemencées en micromasses puis cultivées sous atmosphère hypoxique 5 % O₂, 5% CO₂ et 90% N₂ pendant 7, 14, 21 ou 28 jours en présence de milieu chondrogénique dans un incubateur tri gaz Binder. Ce dernier est composé de DMEM 4500 mg de glucose, supplémenté de 10 % de SVF, de 2 mM de L-glutamine, de 100 U/mL pénicilline, de 100 µg/mL streptomycine, de 50 nM d'ascorbate de sodium, de 10 nM de dexaméthasone (D4902, Sigma), de 10 ng/mL de TGF-β1, de 6.25 µg/mL d'insuline, de 6.25 µg/mL de transferrine et de 6.25 ng/mL de sélénite de sodium.

1.2. Ostéoblastes humains

Les cellules NHOst (Normal Human Osteoblast) sont cultivées dans le milieu OGMTM Osteoblast Growth Medium (Lonza). Elles sont ensemencées à une densité de 10 000 cellules par cm² et amplifiées jusqu'à une densité de 90 %. La minéralisation de ces cellules est obtenue en milieu OGM complémenté de 10 mM de β-glycérophosphate et 200 nM d'hydrocortisone-21-hemisuccinate. Elles sont utilisées comme témoin de la différenciation ostéogénique.

1.3. Test de viabilité cellulaire ou Test d'exclusion au Bleu trypan

Suite aux différents traitements, les cellules encore adhérentes sont décollées à la trypsine puis additionnées au milieu de culture contenant les cellules en suspension. Après une centrifugation de 5 minutes à 800 rpm, le culot cellulaire est repris dans du PBS. Une solution de bleu trypan 0,4 % (Gibco-BRL) est ajoutée au 1/100. Le bleu trypan est un colorant d'exclusion ne marquant que les cellules mortes, il est expulsé par les cellules vivantes. La proportion de cellules mortes (bleues) est déterminée par rapport à la population cellulaire totale. Environ 200 cellules sont comptées dans chaque expérience.

2. TRANSFECTION ET INFECTION DES CELLULES

Afin d'étudier l'importance et le rôle de la Caspase-3 dans la différenciation des CSMs, les cellules sont transfectées ou infectées afin de surexprimer cette protéine ou d'éteindre partiellement son expression.

2.1. Nucléofection

Les CSMs étant difficilement transfectables par les techniques habituelles (transfection au phosphate de calcium, lipofection, électroporation), nous nous sommes orientés vers la nucléofection. Cette technique est développée par Amaxa dans sa gamme « Nucleofector Technology ». Il s'agit d'une combinaison de paramètres électriques et de réactifs optimisés pour la transfection de chaque type cellulaire. Les plasmides sont directement transférés au sein des noyaux cellulaires.

Après 6 jours de culture, les CSMs sont décollées à la trypsine (Eurobio), lavées en PBS et comptées sur cellule de Malassez. Après une centrifugation de 5 minutes à 800 rpm, les cellules sont diluées à une concentration de 2×10^6 cellules par mL dans la solution de Nucléofection supplémentée du kit (Human MSC Nucleofector[®] Kit) (Amaxa, Lonza, Cambrex BioScience, Verviers, Belgique). Avant transfert dans les cuves, 2 μ g de plasmide sont ajoutés à 100 μ L de solution cellulaire. La nucléofection est réalisée avec le programme U23 de l'Amaxa Nucleofector I qui permet une haute efficacité de transfection pour les CSMs mais induit également un plus fort taux de mortalité cellulaire. Enfin, les cellules sont reprises dans 500 μ L de MSCGM (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit) et transférées en plaque 6 puits. Après 6h, les cellules sont cultivées en MEM- α complet.

2.2. Infection virale

L'infection par les particules lentivirales shCaspase-3 (MISSION[®] Lentiviral Transduction Particules, Sigma) permet une extinction partielle de la Caspase 3.

Après 6 jours de culture, les cellules atteignent une confluence d'environ 80 %. Elles sont décollées à la trypsine puisensemencées à 10 000 cellules par puits en plaque 6 puits. Après adhésion des cellules, ces dernières sont infectées par les particules lentivirales (tableau) avec une MOI (Multiplicity Of Infection) de 15. Après 48h d'infection, les particules sont retirées et les cellules sont cultivées en MEM- α complet.

nom	Séquence	MOI
SCR	Numéro de catalogue SHCOO1V	15
shCaspase3-10798	CCGG ⁵²⁴ GTGGAATTGATGCGTGATGTT ⁵⁴⁵ CTCGAGAACATCACGCATCAATTCCACTTTT	15
shCaspase3-3549	CCGG ³⁰⁶ GCGAATCAATGGACTCTGGAA ²²⁶ CTCGAGAACATCACGCATCAATTCCACTTTT	15
shCaspase3-3550	CCGG ³⁴⁶ CCTGAGATGGGTTTATGTATA ³⁶⁷	15

	CTCGAGAACATCACGCATCAATTCCACTTTT	
shCaspase3-3551	CCGG ⁹⁵⁵ AACCGAAAGGTGGCAACAGAATT ⁹⁷⁷ CTCGAGAACATCACGCATCAATTCCACTTTT	15
shCaspase3-3552	CCGG ²¹⁸⁵ CTAAAGGTGGTGAGGCAATAA ²²⁰⁵ CTCGAGAACATCACGCATCAATTCCACTTTT	15

Tableau 1: Séquences des shRNA de Sigma utilisés dans cette étude

3. ANALYSES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

3.1. coloration rouge alizarine

La coloration rouge alizarine permet la visualisation des nodules minéraux produits par les ostéoblastes.

Les CSMs sontensemencées à 10 000 cellules par puits, en plaque 12 puits. Elles sont cultivées pendant 3 semaines en présence de milieu de différenciation ostéogénique ou de milieu DMEM complet. A la fin du traitement, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées au PBS 1X. Les cellules sont incubées 2 minutes en présence de Rouge Alizarine filtré (Rouge Alizarine 2 % ; pH 4, 2) (Sigma). L'excès de colorant est éliminé par 3 lavages d'une minute à l'eau distillée. Les cellules sont alors observées sous microscope Nikon TMS (NIKON INSTRUMENTS EUROPE B. V. , Amstelveen, Pays-Bas).

L'intensité de cette coloration est proportionnelle au statut de différenciation ostéogénique des cellules. La quantification de la surface des nodules minéraux observés à l'objectif fois 40 est réalisée avec le logiciel ImageJ.

3.2. Coloration des chondrocytes

La coloration au bleu alcian permet de révéler la présence de glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs). Les GAGs apparaissent au cours de la différenciation chondrogénique des CSMs.

A la fin de la différenciation chondrogénique, les micromasses de cellules sont placées en plaque 6 puits. Elles subissent 2 rinçages successifs au PBS 1X à 4°C. Les cellules sont fixées à l'éthanol pur et incubées 20 minutes à -20°C. Après rinçage à l'eau distillée, les micromasses sont colorées sur la nuit, dans une solution d'HCl 0, 1 M bleu alcian 0, 1 % (Bleu alcian 8GX - réf 361180 - Réactifs RAL, Martillac, France) à température ambiante. L'excès de colorant est éliminé par un rinçage d'une heure en HCl 0, 1 M. La coloration est ensuite observée sous loupe binoculaire Leica MZ6.

L'intensité de cette coloration est proportionnelle au statut de différenciation chondrogénique des cellules. Elle est quantifiée avec le logiciel ImageJ.

4. MICROINJECTION

La microinjection permet l'insertion mécanique de plasmides ou de protéines directement au sein des cytoplasmes ou des noyaux des cellules. Une sonde fluorescente est co-injectée dans les cellules. Cette technique permet ainsi de voir directement la différence entre les cellules microinjectées et les autres cellules.

La veille, les cellules souches mésenchymateuses sontensemencées sur des lamelles préalablement traitées au PBS-Gélatine 0, 5 %. La lamelle est déposée 1 heure avant la microinjection au centre d'une boîte de Pétri de 2 cm de diamètre dans du milieu MEM- α complet frais.

La microinjection est réalisée sur 300 cellules à l'aide d'un micromanipulateur InjectMan N2 et d'un injecteur FemtoJet (Eppendorf, Le Pecq, France). Les conditions de microinjection utilisées sont de 150 hPa et 0, 1 seconde pour les CSMs.

La protéine d'intérêt est diluée à une concentration 2X dans du PBS 1X puis mélangée volume à volume avec une sonde fluorescente 2X (FITC-dextran 70S 1 %). Après centrifugation, le mélange est injecté dans les cellules. Le nombre de cellules positives (fluorescente et viable) est déterminé 1 heure après l'injection par analyse au microscope à fluorescence inversé, le Leica DMIRE2 (Leica, Rueil, France).

Dans le cadre d'une utilisation ultérieure en immunocytochimie, la sonde fluorescente utilisée sera alors une sonde fixable (Oregon Green) pouvant résister à la perméabilisation des cellules.

5. ANALYSE PROTEIQUE PAR FACS

(FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER)

5.1. Analyse du phénotype des hCSMs

Le phénotype des hCSMs est visualisé par cytométrie en flux en utilisant des anticorps conjugués ou non-conjugués (voir tableau 3). Pour les anticorps non-conjugués, l'anticorps secondaire correspondant est utilisé. Brièvement, 2×10^5 cellules sont resuspendues dans du

milieu complet pendant 30 minutes à 4°C. Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde pour 10 minutes puis perméabilisées dans du PBS contenant 0, 5% de saponine. Les cellules sont alors incubées pendant 30 minutes à 4°C avec l'anticorps primaire dans du PBS-Saponine 0, 25%. Si nécessaire, l'anticorps secondaire est ajouté pour 30 minutes à 4°C. Les cellules sont alors lavées dans du PBS avant l'analyse au FACScalibur (BD Biosciences) en utilisant le logiciel Cell Quest Pro. Les contrôles isotypiques appropriés sont inclus et un minimum de 10 000 évènements est acquis pour chaque condition. Les débris cellulaires sont exclus au cours de l'analyse selon les propriétés FSC/SCC des cellules.

Anticorps	FL utilisée	Distributeur	Référence
CD 11c-PE	FL2-H	BD-Pharmingen	555392
CD 41-PE	FL2-H	Immunotech	AO-7764
CD 34-FITC	FL1-H	Immunotech	PNIM-1870
CD 44-FITC	FL1-H	AbD Serotec	MCA-89F
CD 90-PC5	FL3-H	Beckman Coulter	PNIM-3703
CD 105-FITC	FL1-H	AbD Serotec	MCA-1557F
CD 117- APC	FL4-H	Beckman Coulter	PNIM-3638
HLA DR-PE	FL2-H	Immunotech	464

Tableau 2 : Anticorps utilisés au FACS pour analyser le phénotype des hCSMs.

5.2. Analyse de l'apoptose par marquage à l'Apo2. 7

A la fin du traitement, les cellules sont récupérées et rincées deux fois avec du PBS-1X. Le culot cellulaire est ensuite repris dans du PBS-1X contenant l'anticorps Apo2. 7-PE (Beckman Coulter, réf. IM2088U). Après une incubation à température ambiante de 20 min à l'obscurité, les cellules sont lavées deux avec du PBS-1X puis elles sont analysées à l'aide d'un cytomètre de flux (BD FACScalibur) à la longueur d'onde FL2-H. Un minimum de 10 000 évènements est acquis pour chaque condition. Les débris cellulaires sont exclus au cours de l'analyse selon les propriétés FSC/SCC des cellules.

5.3. Marquage de la Caspase-3 active

A la fin du traitement, les cellules sont récupérées et rincées avec du PBS-1X. Les cellules sont ensuite marquées selon le protocole du fournisseur du kit « PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit » (BD Pharmingen, ref 550914). Brièvement, 1×10^6 cellules sont fixées et perméabilisées pendant 20 minutes, sur glace, avec la solution BD Cytofix/Cytoperm™. Les

cellules sont alors lavées deux fois avec le tampon BD Perm/Wash™. Les cellules sont marquées 30 minutes avec l'anticorps Caspase3 active-PE dilué dans le tampon BD Perm/Wash™, à température ambiante. Les cellules sont alors lavées puis reprise avec le tampon BD Perm/Wash™ avant d'être analysées à l'aide d'un cytomètre de flux (BD FACScalibur) à la longueur d'onde FL2-H. Un minimum de 10 000 évènements est acquis pour chaque condition. Les débris cellulaires sont exclus au cours de l'analyse selon les propriétés FSC/SCC des cellules.

METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. CULTURE BACTERIENNE

1.1. Milieux et conditions de culture bactérienne

Les différentes souches bactériennes sont cultivées à 37°C en milieu Luria Bertani (LB) liquide (BactoTryptone 1 % ; Extraits de levure 0, 5 % ; NaCl 1 % ; pH 7, 0) sous agitation constante ou aussi en milieu solide 2xTY (BactoTryptone 1, 6 % ; Extraits de levure 1 % ; Agar 1, 5 % ; pH 7, 0) à 37°C. Un phénotype de résistance à un antibiotique est conféré aux bactéries par le plasmide avec lequel elles sont transformées. Une pression de sélection en faveur des bactéries transformées est appliquée par l'ajout de l'antibiotique d'intérêt dans le milieu de culture à la concentration indiquée dans le tableau 3.

Antibiotique	Concentration usuelle
Ampicilline	100µg/mL
Kanamycine	50µg/mL
Chloramphenicol	34µg/mL
Tétracycline	10µg/mL

Tableau 3 : Concentration usuelle des antibiotiques de sélection

1.2. Transformation de cellules bactériennes

Les bactéries *E. coli* XL-1 blue et les BL21pLysE sont rendues compétentes et transformées par la méthode du TSS « Transformation and Storage of bacterial cells in the Same solution » avec les produits de ligation (référencés dans Méthodes de biologie moléculaire, § 2. 5 et tableau). Les bactéries sont étalées sur milieu 2xTY en présence de l'antibiotique de sélection (tableau).

2. CONSTRUCTION DES PLASMIDES

2.1. Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN (acide désoxyribonucléique) plasmidique est réalisée avec le kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon le protocole donné par le fournisseur. L'ADN obtenu permet le séquençage des constructions.

L'obtention d'une grande quantité d'ADN plasmidique avec une meilleure pureté est nécessaire à la transfection des cellules. Dans ce cas, l'extraction d'ADN est réalisée avec le kit QIAGEN® Plasmid MidiKit selon le protocole du fournisseur (Qiagen). La vérification de la qualité des ADN obtenus ainsi que leur concentration sont déterminées par dosage au Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (LabTech, France).

2.2. Amplification des fragments par PCR

Les différents inserts sont amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) avec les amorces spécifiques décrites dans le tableau. Ces inserts permettent la construction des plasmides décrits dans le tableau.

	Amorce sens	Amorce anti-sens
Caspase-3 p25	ATGTCTCGGTCTGGTACAGA TGTCGAT	CACTATTTTTATCTCAAGAAAAC ACTCGTACC
Caspase-3 p29	ATGTCTGGAATATCCCTGGA CAACAGTTA	CACTATTTTTATCTCAAGAAAAC ACTCGTACC
Caspase-3 p32	ATGGAGAACACTGAAAAC CAGTGGATTC	CACTATTTTTATCTCAAGAAAAC ACTCGTACC

Tableau 4: Amorces utilisées

————— 40 cycles —————

Température	94°C	94°C	50°C	68°C	72°C	4°C
durée	30 sec	30 sec	1 min	1 min	10 min	∞

Tableau 5 : Cycles

2.3. Digestions enzymatiques

Les enzymes de restriction utilisées sont commercialisées par New England Biolabs (NEB, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Les différents inserts et le plasmide sont digérés par les enzymes de restriction spécifiques aux constructions (voir tableau).

Enzyme de restriction	Tampon NEB	Temps de digestion	Température
-----------------------	------------	--------------------	-------------

BamHI	Tampon 2	3h	37°C
XhoI	Tampon 2 + BSA	3h	37°C

Tableau 6 : Enzymes et tampons utilisés

2.4. Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose et purification

Les produits d'amplification par PCR, les plasmides et les produits de digestion sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose (concentration d'agarose variant selon la taille du produit) dans du tampon TAE 1X (Tris-Acétate 40 mM ; EDTA 1 mM). Après migration, le gel est incubé 5 minutes dans un bain 0,1 M NaCl, 3X Gelred (Gelred nucleic acid gel stain, Interchim, Montluçon, France). Les produits sont purifiés selon le protocole du kit « QIAquick Gel Extraction » (Qiagen).

2.5. Ligation

La ligation des inserts et des plasmides est effectuée selon le protocole du fournisseur de la T4 DNA ligase. Le mélange est incubé à 16°C sur la nuit. Par la suite, ce produit est utilisé pour la transformation de bactéries *E. coli* chimiocompétentes (voir Matériel et Méthodes, §II-1b).

Nom	Plasmide	Insert	Bactéries	Sélection ATB
pcDNA3	pcDNA3	aucun	XL1 blue	Ampicilline
p32	pDEST17	Caspase 3 p32	XL1 blue	Ampicilline
p29	pcDNA3	Caspase 3 p29	XL1 blue	Ampicilline
p25	pcDNA3	Caspase 3 p25	XL1 blue	Ampicilline
p25	pET28b+	Caspase 3 p25	BL21pLysE	Kanamycine

Tableau 7 : Constructions plasmidiques

3. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES ARN

3.1. Extraction d'ARN totaux

L'extraction d'ARN (acide ribonucléique) est réalisée avec le kit RNeasy MiniKit® (Qiagen) selon le protocole donné par le fournisseur. Une fois l'échantillon déposé sur la colonne, il subit une digestion par la DNase (désoxyribonucléase). Après différents lavages, les ARN totaux sont élués dans de l'eau RNase free. Ils sont ensuite dosés au NanoDrop puis conservés à -80°C. La qualité des ARNs totaux est déterminée par la mesure du ratio 28S/18S avec le

bioanalyseur Agilent 2100 en utilisant un kit RNA6000 Nano assay (Agilent Biotechnologies, Agilent-Stratagene, Massy, France).

3.2. PCR (Polymerase Chain reaction) quantitative en temps réel

3.2.1. Transcription Inverse

La synthèse des ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) est réalisée sur 1 µg d'ARN totaux avec le kit Reverse Transcriptase AffinityScript (Stratagene, Massy, France) selon le protocole du fournisseur. La réaction est incubée 10 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 50°C et enfin 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

3.2.2. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est réalisée avec le thermocycleur MX4000 multiplex Quantitative PCR system (Stratagene) et le kit Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene). La réaction contient 1X de Brilliant II SYBR Green QPCR master mix, 200 nM d'amorce sens, 200 nM d'amorce anti-sens (tableau), 30 nM de SYBR Green et 20 ng d'ADNc obtenu précédemment.

La courbe d'amplification est réalisée avec le programme suivant : un cycle de 10 minutes à 95°C, puis 40 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C et 1 minute à 72°C. Une courbe de dissociation est ensuite réalisée : après 1 minute à 95°C, la température est rapidement diminuée à 65°C pour 30 secondes, puis la température est augmentée de 0, 5°C/cycle jusqu'à 95°C.

Gene	Amorce sens	Amorce anti-sens	Amplicon	Fournisseur
ACTB	CGGGACCTGACTGACTACCTC	TCCTTAATGTCACGCACGATTTC	95 bp	Beacon Designer
B2M	TCCAGCGTACTCCAAAGATTTCAGG	AACCCAGACACATAGCAATTCAGG	88 bp	Beacon Designer
COL1A1	GGGATTCCTGGACCTAAAG	GGAACACCTCGCTCTCCAG	63 bp	UPL
DMP1	CCCTTGGAGAGCAGTGAGTC	CACTGGGGTCTTCATTGC	73 bp	UPL
MGP	TCACATGAAAGCATGGAATCTTA	ACGGCTTAGAGCGTTCTCG	131 bp	UPL
NOTCH1	CGCACAAGGTGTCTTCCAG	AGGATCAGTGGCGTCGTC	87 bp	UPL
OCN	CCTCACACTCCTCGCCCTATTG	CGCTGCCCTCCTGCTTGG	122 bp	Beacon Designer
OPN	GAAGTTTCGCAGACCTGACATCC	CACCATCAACTCCTCGCTTTC	86 bp	Beacon Designer
OSX	GAGGCAACTGGCTAGGTGGTG	GGGAGCAAAGTCAGATGGGTAGG	122 bp	Beacon Designer

RUNX2	ACCAGCAGCACTCCATATCTCTAC	CTTCATCAGCGTCAACACCATC	182 bp	Beacon Designer
RUNX2	CACCATGTCAGCAAAACTTCTT	TCACGTCGCTCATTTTGC	96 bp	UPL
SHH	GCTTCGACTGGGTGTACTACG	GCCACCGAGTTCTCTGCT	70 bp	UPL

Tableau 8 : Amorces utilisées en qPCR

3.3. TaqMan[®] Low Density Array (TLDA)

Les TaqMan[®] Low Density Array sont des plaques microfluides de 384 puits (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Elles permettent la réalisation simultanée de 384 PCR, soit l'étude en parallèle de 96 gènes d'intérêt pour 4 échantillons (plan de plaque en annexe).

L'ensemble des ARN est rapporté à une concentration de 1 ng/μL. La transcription inverse est réalisée sur 200 ng d'ARN avec le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription d'Applied Biosystem selon le protocole du fournisseur.

La PCR quantitative en temps réel est réalisée avec l'ADNc obtenu précédemment, 50 μL de TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2X) et d'eau RNase-free pour un volume final de 100 μL.

Les échantillons sont déposés dans les réservoirs de la plaque TLDA et distribués dans l'ensemble des puits par centrifugation. La plaque est celée et les réservoirs supprimés afin d'insérer la plaque dans le TaqMan 7900HT system (Applied Biosystems).

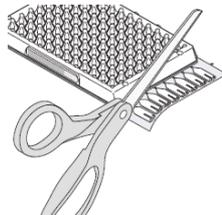


Figure 1 : Elimination des réservoirs de la plaque TLDA après chargement des échantillons

Les résultats obtenus sont analysés avec le logiciel SDS Software du fournisseur.

METHODES DE BIOCHIMIE

1. SYNTHÈSE, PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES

1.1. Synthèse *in vitro* de protéines

Les protéines radiomarquées sont synthétisées *in vitro* avec le système TNT (TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems). Ce système couple la transcription et la traduction,

conformément au protocole du fournisseur (Promega, Charbonnières, France). Cette synthèse est réalisée en présence d'ARN polymérase (T7 ou SP6 selon le plasmide), de réticulocytes de lapin dépourvu de nucléases (mélange de facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison d'ARNt et d'ARNr), d'un mélange d'acides aminés et de méthionine-³⁵S (Amersham Biosciences, GE healthcare, Orsay, France).

Après la synthèse *in vitro*, la quantité de protéine radio-marquée est estimée à partir de la quantité de méthionine-³⁵S incorporée dans la protéine. Pour cela, une précipitation au TCA (acide trichloroacétique) est réalisée d'après le protocole du fournisseur.

Un deuxième système de synthèse *in vitro* est également utilisé, le FluoroTectTM Green_{Lys} *in vitro* Translation Labeling System (Promega). Ce système est basé sur le même principe que le système TNT, il est non radioactif mais basé sur une sonde fluorescente Green_{Lys}.

1.2. Production de protéines recombinantes

La production de protéines est réalisée dans les bactéries *E. coli* BL21pLysE transfectées avec le vecteur d'intérêt, ici le pET28b⁺ Caspase-3 p25. Les bactéries sontensemencées dans 500 mL de milieu LB en présence de Kanamycine. La courbe de croissance est réalisée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm. La production de la protéine est induite par ajout d'IPTG à 0, 1 mM lorsque la DO atteint 0, 600. Après 4h d'induction à 37°C, les bactéries sont centrifugées à 4500g pendant 30 minutes. Les culots bactériens sont alors conservés à -80°C jusqu'à l'extraction protéique.

1.2.1. Extraction de protéines recombinantes

Les bactéries contenant le pET28b⁺ Caspase-3 p25 sont lysées dans 10 mL de CelLyticTM Plus (Sigma) contenant 400 µL de Lysozyme, 200 µL d'inhibiteurs de protéases et 1000 U de Benzonase (CelLyticTM B Plus Kit, Sigma). Les bactéries sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante, sous agitation, puis centrifugées pendant 5 minutes à 1900 g. Le surnageant contenant la fraction protéique est conservée à 4°C.

1.2.2. Purification des protéines His-tag

Dans un premier temps, le gel d'affinité HIS-Select[®] Nickel (P6611, Sigma) est transféré dans une colonne. Ce dernier est rincé 2 fois avec de l'eau déionisée et 1 fois avec un tampon

contenant 50 mM NaHPO₄. Le gel est ensuite équilibré avec un tampon composé de 50 mM NaHPO₄ et 300 mM NaCl.

Les extraits bactériens sont incubés sur le gel pendant 15 minutes, sous agitation et à température ambiante. Après une centrifugation de 5 minutes à 4500 g, à 4°C, le gel est rincé 3 fois avec le tampon de lavage (50 mM NaHPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole).

Les protéines His-tag sont alors éluées dans le tampon suivant : 50 mM NaHPO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole. L'absorbance à 280 nm est mesurée pour chacune des fractions de lavage et d'éluion.

Les fractions sont dialysées 3 fois à 4°C dans du PBS, filtrées sur une membrane dont les pores mesurent 0,2 µm de diamètre. Les fractions sont dosées avec la méthode de Bradford (Protein Determination, Biorad).

Les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide (voir Méthodes de biochimie, §2-g) afin de réaliser une immunoempreinte (voir Méthodes de biochimie, §2-h) et une immunodétection (voir Méthodes de biochimie, §2-i).

2. ANALYSES PROTEIQUES

2.1. Extraction des protéines totales

Les cellules sont collectées, centrifugées 5 minutes à 800 g à 4°C et lavées 2 fois avec du PBS 1X. Les culots cellulaires sont lysés dans du tampon RIPA [Sodium-Vanadate ; Nonidet P40 1 % ; Sodium-désoxycholate 0,5 % ; SDS 0,1 % dans du PBS ; additionné d'une plaquette de cocktail d'inhibiteurs de protéases Mini[®] de Roche pour 10 mL de solution (Roche, France)]. Les échantillons sont homogénéisés, incubés 30 minutes sur glace puis centrifugés pendant 30 minutes à 13 000 g à 4°C. Les protéines sont dosées par la méthode Bradford (BioRad, Hercules, USA) par lecture de l'absorbance à 595 nm.

Par ailleurs, pour l'analyse de complexes protéiques, les culots cellulaires sont lysés 30 minutes sur glace dans du tampon CHAPS [CHAPS 1 % ; inhibiteur de protéase, PBS]. Les lysats sont alors centrifugés pendant 30 minutes à 10 000 g à 4°C.

2.2. Extraction des protéines nucléaires

Les cellules sont décollées au grattoir puis centrifugées à 800 g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots sont lavés au PBS puis centrifugés à 800 g pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules sont alors lysées avec le tampon de « Chromatin ImmunoPrecipitation » (1 % SDS; 10 mM

EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 ; 1 mM PMSF ; 10 µg/ml aprotinine ; 10 µg/ml leupeptine ; 10 µg/ml pepstatine ; 1mM Sodium-Vanadate et 50mM NaF). Les lysats sont soniqués à froid jusqu'à leur fluidité totale puis dosés. La concentration est ajustée à 1 µg/mL.

2.3. Fractionnement subcellulaire

Les cellules sont récoltées puis centrifugées à 750 g pendant 5 minutes, puis subissent deux lavages successifs au PBS 1X par centrifugation de 5 minutes à 750 g. Le culot cellulaire est repris volume à volume par rapport à la taille du culot obtenu, dans du tampon CEB (250 mM sucrose, 50 mM Hepes pH 7.5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl, 1 mM DTT, 10 µM Cytochalsasin B, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, plaquette d'inhibiteurs de protéases). Les cellules sont ensuite cassées manuellement à l'aide d'un Potter en verre par 30 à 40 mouvements de piston (Kontes gloss Dull 20, VWR).

Une centrifugation à 750 g permet l'élimination des débris cellulaires et des noyaux. Le surnageant est de nouveau centrifugé à 13 000g pendant 15 minutes à 4°C pour obtenir la fraction mitochondriale (Mito). Cette dernière est reprise dans un volume de tampon CEB. Le surnageant (S13) subit une dernière centrifugation à 100 000 g pendant 30 minutes permettant la séparation des protéines cytosoliques (S100) et la fraction microsomale. Les échantillons sont dosés par la méthode Bradford puis conservés à -80°C.

2.4. Association des protéines synthétisées dans un système acellulaire

La Caspase-3 synthétisée (voir Méthodes de Biochimie, §1-a), est incubée pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C avec 100 µg de protéines cytosoliques, S100. La fraction protéique S100 est obtenue lors du fractionnement cellulaire (voir Méthodes de Biochimie, §2-c). Après l'incubation, les échantillons sont alors déposés sur gel de polyacrylamide.

Pour les échantillons incubés avec des protéines du Système TNT, le gel est séché puis déposé dans une cassette « Storage Phosphor screen » (Amersham). Après 48 h d'exposition, la cassette est lue au Phosphoimager (Amersham).

Pour les échantillons incubés avec des protéines FluoroTectTM Green_{Lys}, le gel est directement lu au Phosphoimager.

2.5. Pontage moléculaire ou Crosslinking

Les échantillons protéiques cellulaires sont dilués à 2 mg/mL pour les expériences de pontages avec les agents hydrophobes DMA (Diméthyl adipimidate), DMS (Diméthyl subérimidate) ou les agents hydrophiles DSS (Disuccinimidyl subérate) et l'EGS (Ethylène glycolbis [disuccinimidyl subérate]). L'ensemble des agents pontants sont commercialisés par Pierce (Pierce, Thermo Fischer Scientific, Cergy Pontoise, France)

Les échantillons sont incubés en absence ou en présence de 5 mM d'agent pontant pendant 30 minutes à température ambiante. Les réactions sont arrêtées par addition de Tris-HCl (pH 7, 5) à 25 mM final. Les complexes formés sont alors analysés par immunoempreinte sur gradient polyacrylamide 4 %-15 %.

2.6. Gels Bidimensionnels (2D)

La technique du BN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis) décrite par Schägger (2001) permet d'analyser l'oligomérisation de complexes protéiques et la masse moléculaires de ces composants par électrophorèse en condition native puis une 2eme dimension en condition dénaturante.

2.6.1. Préparation des échantillons

Les échantillons sont dilués à 2 mg/mL dans du PBS, Glycérol 10 %, CHAPS 0, 4 %.

2.6.2. BN-PAGE (1^{ère} dimension)

Les échantillons sont déposés sur un gel natif en gradient polyacrylamide 5-14 % (tableau 9). La composition des tampons 3X, anodique et cathodique est décrite dans le tableau 10. La migration est effectuée sur la nuit à 10 mA et 120 V. Les pistes de BN-PAGE sont alors découpées et conservées à -80°C.

	Gel de concentration	Gel de séparation 5 %	Gel de séparation 14 %
Acryl-bisacrylamide 30 %	1, 6 mL	3 mL	8, 4 mL
Gel Buffer 3X	4 mL	8 mL	6 mL
Glycérol 20 %		180 µL	3 mL
APS 10 %	120 µL	180 µL	180 µL

TEMED	12 µL	12 µL	12 µL
H ₂ O	6, 26 mL	6, 8 mL	413µL

Tableau 9 : Composition des gels nécessaires au BN-PAGE

	Composition
Gel Buffer 3X	1. 5 M Acide 6-aminohexanoïque, 75 mM Imidazole, pH 7. 0
Tampon anodique	25 mM Imidazole, pH 7. 0
Tampon cathodique	50 mM Tricine, 7. 5 mM Imidazole, 0. 002 % Bleu de coomassie, pH 7. 0

Tableau 10 : Composition des tampons nécessaires au BN-PAGE

2.6.3. SDS-PAGE (2^{ème} dimension)

Chaque piste est incubée 2 h à température ambiante sous agitation dans un bain SDS 1 %, β-mercaptoéthanol 1 %, puis rincées au moins 3 fois 10 minutes dans de l'eau distillée. Le montage pour la deuxième dimension est réalisé en plaçant la piste comme gel de concentration. Le gel de séparation (gradient de polyacrylamide 12-4 %) est coulé sous la piste de BN-PAGE alors que le gel de concentration entoure la piste. La migration est effectuée à 4°C, 10 mA, 100 V sur la nuit. Une immunoempreinte est alors réalisée (voir Méthodes de Biochimie §2-h).

2.7. Electrophorèse

Les échantillons protéiques sont dilués dans du tampon de charge 4X [Tris 125mM pH 6, 8 ; SDS 0, 04 % ; Glycérol 0, 2 % ; bleu de Bromophénol 0, 02 %] additionné de β-mercaptoéthanol 0, 2 M. Les échantillons sont dénaturés à température ambiante sur la nuit. Ils sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) dans du tampon de migration [Glycine 400 mM ; Tris 1, 2 M ; SDS 1 %]. La méthode utilisée au laboratoire est celle décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Le maillage du gel est choisi en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêt (tableau). La migration est réalisée en courant constant.

Concentration d'acrylamide (%)	Gamme de séparation (kDa)
---------------------------------------	----------------------------------

15	12-45
10	15-70
6	40-220

Tableau 11 : Gamme de séparation des gels SDS-PAGE

2.8. Immunoempreinte

Une membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) Immobilon (Millipore) est conditionnée en présence de méthanol pur avant d'être rincée à l'eau distillée. La membrane est incubée dans le tampon de transfert [Glycine 40 mM ; Tris 120 mM; Méthanol 20 %]. Les protéines sont alors transférées sur la membrane en milieu semi-sec avec le Semidry blotter 2020 (Apelex, Massy, France), en voltage constant de 10 V entre 30 et 75 minutes selon la taille des protéines d'intérêt.

2.9. Immunodétection ou Western-Blotting

La membrane de PVDF est saturée 30 minutes dans une solution de PBS-lait 5 %. La détection des protéines d'intérêt est réalisée par une incubation en présence de l'anticorps primaire dans une solution de PBS-lait 1 %. La membrane est lavée 3 fois 10 minutes avec du PBS-Tween 20 0,1 %-lait 1 %, puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horseradish Peroxidase) (Biorad) dans une solution de PBS-lait 1 % (voir tableau Anticorps).

Après 3 lavages de 10 minutes, l'immunomarquage de la membrane est révélé par chimioluminescence avec le kit ImmobilonTM Western (Millipore, Guyancourt, France). Les signaux sont visualisés sur des films CL-XposureTM film (Pierce) ou HyperfilmTM (Amersham Biosciences).

Anticorps primaires	Fournisseur	Reference	Type	Stockage	Dilution WB	Dilution ICC
Actine	Chemicon	MAB1501R	souris mono. IgG1	-20°C	1/1000	1/1000
Atg5L (N-term)	Abgent (Interchim)	AP1812a	lapin poly. IgG	-20°C	1/500	
Atg6 (Beclin 1)	Novus	NB500-249	lapin poly. IgG	4°C	1/1000	
Atg6 (Beclin)	BD Transduction Lab.	612113	souris mono. IgG2a	-20°C	1/500	
Atg7	Rockland (Tébu)	600-401-487	lapin poly. IgG	-20°C	1/500	
Atg8 (LC3)	MBL	PD014	lapin poly. IgG	-20°C	1/1000	
ATM (D2E2)	Cell Signaling (Ozyme)	#2873S	lapin poly. IgG	-20°C	1/250	
ATM Phospho (pS1981)	Epitomics	#2152-1	lapin mono. IgG	-20°C	1/500	

ATR	Cell Signaling (Ozyme)	#2790S	lapin poly. IgG	-20°C	1/250	
β Tubulin	Sigma	T 0198	souris mono. IgG1	-20°C	janv-00	1/1000
Bax (43-61)	Dako	A3533	lapin poly. IgG	4°C	1/500	1/1500
Bax 2D2	Beckman Coulter	731730	souris mono. IgG1	4°C	1/100	1/100
Bax 6A7	Beckman Coulter	731731	souris mono. IgG1	4°C	1/100	1/100
Bcl2	Dako	M 0887	souris mono. IgG1	4°C	1/500	1/500
Bcl-x	Transduction Lab.	610747	souris mono. IgG1	-20°C	1/500	1/500
Bcl-x	Transduction Lab.	610212	lapin poly. IgG	-20°C	1/1000	1/1000
BMP-2 (N-14)	Santa Cruz	sc-6895	chèvre poly. IgG	4°C	1/500	
BNIP3L (A01)	Abnova (Tébu)	H00000665-A01	souris poly	-20°C		1/2000
Bnip3L (Ab-1)	Oncogene	PC525	lapin poly. IgG	-20°C	1/1000	
Calbindin-D	Sigma	C8666	souris mono.	-20°C	1/500	1/200
Caldesmon-1	Cell Signaling (Ozyme)	2980	lapin poly. IgG	-20°C	1/200	
Calmodulin	Millipore	05-173	souris mono. IgG1	-20°C	1/500	
Calpain (small subunit)	Chemicon	MAB3083	souris mono. IgG1	-20°C	1/1000	1/100
Calpain 1 (15C10)	Santa Cruz (Tébu)	sc-58323	souris mono. IgG	4°C	1/1000	
Caspase 3 (E-8)	Santa Cruz (Tébu)	sc-7272	souris mono. IgG2a	4°C	1/1000	
Caspase 3 active	Pharmingen	559565	lapin mono.	4°C	non	1/1000
Caspase 6	MBL	M070-3	souris mono. IgG1	-20°C	1/1000	1/100
Caspase 6 (Mch2p20(K-20))	Santa Cruz (Tébu)	sc-1232	chèvre poly. IgG	4°C	1/100	
Caspase 7	Pharmingen	556541	souris mono. IgG1	4°C	1/1000	
Caspase 7 (Ab-1)	Oncogene (Calbiochem)	PC334	lapin poly. IgG	4°C	1/100	
Caspase 8	Pharmingen	559932	lapin poly IgG	4°C	1/1000	
Caspase 8 (Mch5p20(T-16))	Santa Cruz (Tébu)	sc-6134	chèvre poly. IgG	4°C	1/100	
Caspase 9	Pharmingen	556585	lapin poly IgG	4°C	1/500	
Caspase 9	Pharmingen	66571A	souris mono. IgG1	4°C	1/250	
Caspase 9 (I20)	Biodesign (Interchim)	K88327R	lapin poly	4°C	1/1000	
CD133 (AC 133)	Abgent	AM1130a	souris mono. IgG1	-20°C		FACS
Cytochrome C	R&D Systems	MAB897	souris mono. IgG2b	-20°C	1/1000	1/1000
EF1A	Cell Signaling (Ozyme)	2551	lapin poly. IgG	-20°C		
F1ATPase	Mol. Probes (Interchim)	A-21350	souris mono. IgG2b	-20°C	1/1000	1/1000
GATA-1 (N6)	Santa Cruz (Tébu)	sc-265	rat mono. IgG2a	4°C	1/100	1/100
GATA-1(M-20)	Santa Cruz (Tébu)	sc-1234	chèvre poly. IgG	4°C	1/500	
Grp75	StressGen	SPA-825	souris mono. IgG1	-20°C	1/1000	1/200
Grp78 (N20)	Santa Cruz (Tébu)	sc-1050	chèvre poly. IgG	4°C	1/500	
HIF-1 α	BD Trans Lab	610959	souris mono. IgG1	-20°C	1/100	non
HIF-1 α (28b)	Santa Cruz (Tébu)	sc-13515	souris mono. IgG1	4°C	1/200	1/100
hnRNP	Santa Cruz (Tébu)	sc-32310	souris mono. IgG1	4°C	1/500	
HSP70	Santa Cruz (Tébu)	sc-66048	souris mono. IgG1	4°C	1/500	
HSP90	Santa Cruz (Tébu)	sc-1055	chevre poly	4°C	1/200	
LASP-1 (S-13)	Santa Cruz (Tébu)	sc-103595	chevre poly	4°C	1/500	
Mcl-1	Pharmingen	554103	lapin poly. IgG	4°C	1/500	
Notch1 G20	Santa Cruz (Tébu)	sc-23301	chevre	4°C	1/200	1/200
Notch1 S20	Santa Cruz (Tébu)	sc-23304	chevre	4°C	1/200	1/200
Osteopontine	Abcam	ab8448	lapin poly	-20°C	1/1000	
Phospho- β -Catenin (Thr41/Ser45)	Cell Signaling	9565	lapin poly. IgG	-20°C	1/1000	
Phospho-Histone H2AX (Ser139)	Millipore	05-636	souris mono. IgG1	-20°C		1/500

Runx2/Cbfa1	RD systems	AF2006	chevre poly	-20°C	1/500	
Shh C12	Santa Cruz (Tébu)	sc-33942	chevre poly	4°C	1/200	1/200
Shh G20	Santa Cruz (Tébu)	sc-33943	chevre poly	4°C	1/200	1/200
Shh N19	Santa Cruz (Tébu)	sc-1194	chevre poly	4°C	1/200	1/200
VEGF	Pharmlingen	555036	souris mono. IgG2bk	4°C	1/1000	

Tableau 12 : Anticorps primaires utilisés en immunoempreinte et immunocytochimie

Anticorps secondaires	Fournisseur	Reference	Type	Stockage	Dilution WB	Dilution ICC
Lapin couplé à la peroxydase	Biorad	75011		4°C	1/2000	
Souris couplé à la peroxydase	Biorad	75031		4°C	1/2000	
Chèvre couplé à la peroxydase	Rockland (Tébu)	605-4313	chèvre poly.	-20°C	1/4000	
Chèvre Alexa Fluor 488	Mol. Probes (Invitrogen)	A11055	âne	-20°C		1/400
Chèvre Alexa Fluor 568	Mol. Probes (Invitrogen)	A11057	âne	-20°C		1/400
Lapin Alexa Fluor 488 (vert)	Mol. Probes (Invitrogen)	A-11008	chèvre	-20°C		1/400
Lapin Alexa Fluor 568 (rouge)	Mol. Probes (Invitrogen)	A-11011	chèvre	-20°C		1/400
Souris Alexa Fluor 488 (vert)	Mol. Probes (Interchim)	A-11001	chèvre	-20°C		1/400
Souris Alexa Fluor 568 (rouge)	Mol. Probes (Interchim)	A-11004	chèvre	-20°C		1/400

Tableau 13 : Anticorps secondaires utilisés en immunoempreinte et immunocytochimie

3. IMMUNOCYTOCHIMIE

3.1. Marquage immunocytochimique

Des lamelles en verre sont déposées dans une plaque 24 puits (Falcon, VWR international, SA, France) et saturées avec du PBS/ Gélatine 0, 1 % pendant 30 minutes à 37°C.

Les CSMs sontensemencées à raison de 10 000 cellules par puits et traitées au bout de 24 heures. Les cellules sont rincées au PBS puis fixées 30 minutes à température ambiante au paraformaldéhyde (PBS 1X ; 4 % Paraformaldéhyde ; 0, 15 % Acide picrique). Après 3 lavages au PBS 1 X, et une étape de perméabilisation de 10 minutes à température ambiante avec du PBS / SDS 0, 1 %, les cellules sont rincées 3 fois puis saturées 30 minutes à 37°C en présence de PBS / Gélatine 5 %.

La lamelle est incubée 1 heure à 37°C avec l'anticorps primaire puis lavée 3 fois au PBS 1X. Les cellules sont ensuite incubées 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor, Invitrogen). Chaque anticorps est dilué de façon spécifique dans

du PBS/ Gélatine 1 % (voir le tableau Anticorps). Après 3 lavages au PBS 1X, les cellules peuvent être incubées avec un deuxième anticorps primaire ou subir un marquage nucléaire au DRAQ5 (Interchim). Le DRAQ5 est un agent intercalant de l'ADN permettant le marquage du noyau.

Après réalisation de l'ensemble des marquages, les lamelles sont montées sur lames avec un agent polymérisant, le Mowiol [25 % Glycérol ; 10 % Mowiol (Calbiochem, Merck Chemicals Ltd, Darmstadt, Germany) ; 0, 1M Tris HCl pH 8, 5 ; H₂O]. Les lames sont conservées à 4°C pour une observation ultérieure au microscope confocal Leica TCS-SP1 (Leica).

3.2. Activité Calpaïne *in vivo*

L'activité de la Calpaïne peut être étudiée *in vivo* par l'utilisation d'un substrat catalysé en produit fluorescent.

Les CSMs sontensemencées à raison de 10 000 cellules par puits puis les cellules sont traitées 24 heures après ensemencement. Après les traitements, les cellules sont incubées 1h à 37°C en présence de *t*-BOC-Leu-Met 3μM (7-amino-4-chloromethylcoumarin, *t*-BOC-L-leucyl-L-méthionine amide ; A6520, Invitrogen) puis rincées 3 fois au PBS 1X. Les lamelles sont alors montées sur lames avec du Mowiol et analysées un microscope confocal.

3.3. Analyse des marquages γ -H2AX avec BlobFinder

BlobFinder est un logiciel gratuit permettant l'analyse de marquages à partir d'images de microscopie à fluorescence (Immunocytochimie). Ce logiciel est développé par « The Centre for Image Analysis » de l'Université d'Uppsala, Etats-Unis (1). Nous l'utilisons afin de quantifier le nombre de foci γ -H2AX présents dans nos cellules après différents traitements.

L'ensemble des coupes d'immunocytochimie (z-stack) est pré-analysé, une image 2D est créée avec l'intensité maximum de projection. Les noyaux cellulaires sont séparés du bruit de fond avec la méthode de définition de seuil d'Otsu (2). Le manipulateur définit le seuil pour l'ensemble des images d'immunocytochimie et désigne un foci γ -H2AX comme une entité de 15 x 15 pixels. BlobFinder détecte l'ensemble des foci présents dans tous les noyaux.

4. ACTIVITES ENZYMATIQUES

4.1. Dosage de l'activité Caspase

L'activité DEVDase est mesurée en plaque 96 puits. Une incubation préalable de 30 minutes à 37°C est réalisée en présence de 10 µg de protéines, 10 µL de DTT 100 mM, 32 µL de tampon Caspase [312. 5 mM HEPES pH 7. 2, 31. 25 % sucrose, 0. 3125 % CHAPS, inhibiteurs de protéases] complété à un volume final de 98 µL avec de l'eau MilliQ (Kit caspASE assay system, Fluorometric, Promega). Au temps zéro, le substrat ac-DEVD-AMC (Promega) est ajouté à une concentration finale de 50 µM. La fluorescence est alors mesurée toutes les 15 minutes pendant 2 heures au fluorophotomètre Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron corporation, Courtaboeuf, France) avec des filtres d'excitation 365 nm et d'émission 465 nm.

L'activité spécifique est calculée à partir de la pente de la courbe de DO en fonction du temps et rapportée à la concentration de protéines utilisées.

4.2. Dosage de l'activité Calpaïne

L'activité Calpaïne est également mesurée en plaque 96 puits. Une incubation préalable de 30 minutes à 37°C est réalisée en présence de 10 µg de protéines dans un volume final de 98 µL de tampon Calpaïne (115 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM Na-HEPES pH 7. 4). Au temps zéro, le substrat SLLVL-AMC (Bachem) est ajouté à une concentration finale de 50 µM. La fluorescence et l'activité spécifique sont mesurées comme précédemment.

4.3. Dosage de l'activité du protéasome

De même, l'activité du protéasome est mesurée en plaque 96 puits. L'incubation est réalisée en présence de 10 µg de protéines dans un volume final de 95 µL de tampon Protéasome [20 mM Hepes pH 7, 9 ; 0, 5 mM EDTA ; 0, 035 % SDS]. Au temps zéro, le substrat Z-LLL-AMC (Bachem, Weil am Rhein, Allemagne) est ajouté à une concentration finale de 50 µM. La fluorescence et l'activité spécifique sont mesurées comme précédemment.

4.4. Dosage de l'activité de la Phosphatase Alcaline

La phosphatase alcaline (PAL) est un marqueur de la différenciation ostéogénique dans le cas des cellules souches et un marqueur de l'activité cellulaire dans le cas des ostéoblastes.

Les cellules sont cultivées en plaque 12 puits. A la fin de la différenciation, les plaques sont rincées au PBS 1X puis congelées à sec jusqu'à l'extraction protéique.

Les plaques sont placées sur glace car la PAL est active à 37°C. Les cellules sont grattées dans du Nonidet P-40 (NP40) 0, 2 %. La totalité du lysat cellulaire est transférée dans des tubes à hémolyse puis soniquée 30 secondes. Le lysat est centrifugé 5 minutes à 3000 rpm et à 4°C.

Une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution-mère de BSA afin de calculer la concentration protéique des échantillons.

Chaque échantillon est dilué au 1/50^{ème} dans du NP40 0, 004 % puis au demi avec du bleu de coomassie. Après agitation, chaque échantillon est dosé en duplicat à une longueur d'onde de 595 nm. Le Victor³V (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) donne directement la concentration des échantillons en µg/mL.

Les tubes contenant 900 µL de réactif de la PAL [10mM p-Nitrophenylphosphate ; 560 mM 2-amino-2-méthyl-1-propanol (AMP) pH 10, 3 HCl ; 1 mM MgCl₂] sont préchauffés à l'obscurité dans un bain thermostaté à 37°C.

Le temps de réaction pour le dosage de la PAL est déterminé grâce à un lysat contrôle (échantillon positif au test). Au temps zéro, 100 µL de ce lysat sont ajoutés au réactif de la PAL. Dès l'obtention d'une coloration jaune, la réaction est arrêtée par l'ajout de 400 µL de NaOH 1 M et ceci détermine le temps de réaction du test.

Les dosages sont réalisés par l'ajout de 100 µL de lysat cellulaire aux 900 µL de réactif de la PAL préalablement chauffés. Les réactions sont arrêtées au temps déterminé (échantillon témoin) par l'ajout de 400 µL de NaOH 1 M. Les tubes sont alors conservés dans la glace et à l'obscurité. L'absorbance de chaque échantillon est lue à une longueur d'onde de 450 nm.

L'activité de la phosphatase alcaline (en Pi/min/µg de protéine) est déterminée selon la formule suivante :

$$\frac{DO \times 3 \times 10^{-3} \times 10^6}{18, 182(\epsilon) \times \text{temps} \times \text{volume (mL)} \times \text{Concentration protéique}}$$

(DO : densité optique à 450nm ; 18, 182 : coefficient d'extinction molaire ; Temps : Temps de la réaction pour obtenir la couleur jaune ; Volume : volume déposé dans le puits pour le dosage de la DO ; Concentration protéique : concentration protéique de l'échantillon).

5. MESURE DE LA CAPACITE AUTOPHAGIQUE

L'autophagie est un processus permettant la dégradation des protéines à longue durée de vie. Elle est également caractérisée par la présence de vacuoles autophagiques, les autophagosomes et les autophagolysosomes. Ce sont les deux caractéristiques qui sont communément mesurées pour évaluer le niveau d'autophagie dans les cellules (Galluzzi *et coll.*, 2009).

5.1. Induction de l'autophagie

L'autophagie est induite par une carence nutritive avec privation d'acides aminés et de sérum. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X puis incubées 6 heures dans du Hank's Buffered Salts Solution (HBSS) tamponné avec 2, 2 g/L NaHCO₃ and supplémenté de 0, 1 % BSA.

5.2. Marquage des vacuoles autophagiques par le MDH

Le monodansylpentane (MDH) est un marqueur lipophile qui s'accumule préférentiellement dans les structures multi-lamellaires. Il permet le marquage des autophagosomes et des autophagolysosomes dans des cellules vivantes (Niemann *et coll.*, 2001). A l'inverse, le marquage monodansyl cadaverine (MDC) est effectué sur des cellules fixées.

Les cellules sont cultivées sur lamelles de verre préalablement traitées avec du PBS-gélatine 0, 1 %. Les cellules sont traitées soit en milieu complet, soit en milieu carencé. A la fin du traitement, les cellules sont incubées 30 minutes à l'obscurité à 37°C avec 200 µM de MDH, puis lavées avec du PBS. Les lamelles sont montées sur lame avec du milieu polymérisant Mowiol avant d'être visualisées sous UV (longueurs d'ondes : excitation à 359 nm et émission à 525 nm). L'analyse du marquage est réalisée dans les 24h afin d'éviter la diffusion de la fluorescence.

5.3. Mesure de la dégradation des protéines à longue durée de vie par protéolyse

La capacité autophagique est étudiée par mesure de la dégradation des protéines à longue durée de vie. Les cellules sont incubées pendant 24h avec de la [¹⁴C]-L-valine à 0, 1 µCi/mL (Amersham) dans du milieu complet. Cette incubation permet l'incorporation du radioélément dans les protéines néosynthétisées. Le milieu de marquage est éliminé et les cellules sont lavées 3 fois au PBS 1X. Afin d'éliminer du dosage la dégradation des protéines à renouvellement rapide, une préchasse d'une heure est réalisée dans un milieu complet en présence d'excès de 10 mM de L-valine non radiomarquée. Après 3 lavages au PBS 1X, une chasse froide de 6h ou 9h est réalisée en présence d'un excès de 10 mM de valine non radiomarquée dans du milieu complet pour les conditions contrôles et HBSS-BSA 0, 1 % pour le traitement de carence.

Le milieu de culture et les cellules sont précipités sur la nuit à 4°C respectivement avec du TCA 80 % et du TCA 10 % (TCA : TriChloroAcetic).

Le milieu de culture est centrifugé 20 minutes à 13 000 g. Le surnageant est ajouté à 4 mL de liquide de scintillation Picofluor[®] (Perkin Elmer). Le culot est repris dans du NaOH 0, 4 M. Les cellules sont grattées dans du NaOH 1 M et ajoutées au culot. Cet ensemble est transvasé dans des fioles de comptage contenant du Picofluor[®].

La radioactivité est mesurée en coups par minute à l'aide du « Liquid scintillation analyser Tri-carb 2100TR » (Perkin Elmer).

La dégradation des protéines à longue durée de vie est la mesure de la quantité d'acides aminés libres radiomarqués présents dans le surnageant par rapport à la radioactivité totale.

5.4. Visualisation des vacuoles autophagiques par microscopie électronique à transmission

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits. Après 24h d'adhérence, les cellules sont placées en condition de carence nutritive. Après un lavage au PBS 1 X, les cellules sont fixées pendant 30 minutes à 37°C avec du PBS – 4 % glutaraldéhyde pH 7, 4. Après un rinçage au PBS 1X, les cellules sont post-fixées pendant 1 heure à température ambiante avec du PBS 1 X – 2 % acide osmique. Enfin, après un lavage en PBS 1 X, les cellules sont déshydratées par une série de bains successifs de concentration croissante en éthanol. Les cellules sont incubées 24 heures à température ambiante avec de la résine Epoxy composée d'un mélange d'épon et d'éthanol. Le surplus de résine est éliminé et des gélules de résine sont déposées dans les boîtes. Les cellules sont alors incubées 24 heures à 37°C puis 48

heures à 50°C. Les gélules sont décollées. La surface en contact avec la boîte permet de récolter une monocouche de cellules fixées. Des coupes ultra-fines (60 à 70 nm) sont réalisées à l'aide d'un couteau diamant sur le Reichert Ultracut E microtome. Les coupes sont ensuite contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb, avant d'être observées au microscope électronique à transmission JEM-1010 à 80 kV (JEOL, Tokyo, Japon). Les images sont analysées *via* logiciel Leica Q-WIN.

6. 2D-DIGE ET MALDI TOF TOF

L'électrophorèse bidimensionnelle consiste à séparer les protéines d'un échantillon selon deux paramètres, leur point isoélectrique ou pI (pH pour lequel la charge globale de la molécule est nulle) et leur poids moléculaire.

L'intérêt de la 2D-DIGE réside dans la capacité à comparer la composition de plusieurs échantillons protéiques (au niveau qualitatif (protéines synthétisées ou non)) et au niveau quantitatif. Pour cela, les protéines de chaque échantillon sont marquées avec des fluorophores différents (cyanines Cy3 et Cy5) avant d'être mélangé 2 par 2 et un standard interne marqué à la cyanine 2 est introduit dans chaque mélange. Les échantillons sont alors séparés selon leur point isoélectrique et leur poids moléculaire. La lecture des gels aux différentes longueurs d'onde permet ensuite de comparer les profils de migration des différents échantillons.

L'identification et la caractérisation des protéines d'intérêt sont alors réalisées par spectrométrie de masse sur le 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems). Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry).

6.1. Préparation des échantillons

L'expérience nécessite 4 réplicats biologiques indépendants. Les cellules sont récoltées puis rincées au PBS 1X afin d'éviter toute contamination avec des protéines du milieu de culture. Les échantillons sont lysés sous agitation dans un volume de tampon Urée 7M/thiourée 2M/CHAPS 4% pendant 2 heures à 4°C. Les lysats sont soniqués 2 fois 30 secondes puis

centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm et à 4°C. Le dosage protéique au Bradford est réalisé en triplicat.

La purification des échantillons est réalisée avec le kit 2-D Clean-Up (réf. 80-6486-60, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Orsay France) selon le protocole du fournisseur. Un volume d'échantillon est incubé 15 minutes sur glace avec 3 volumes de précipitant. Trois volumes de coprecipitant (pour un volume d'échantillon) sont ajoutés puis les échantillons sont centrifugés 10 minutes, 12 000 xg à 4°C. Le surnageant est rapidement éliminé et les échantillons sont centrifugés 1 minute à 12 000xg et à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots sont rincés avec 100 µL de coprecipitant. Les tubes sont centrifugés 5 minutes, 12 000xg et à 4°C. Après ajout de 50 µL d'eau MilliQ, les culots sont décollés. Afin de dissocier les culots, 1 mL de tampon de lavage froid et 50 µL d'additif/d'adjuvant sont ajoutés puis incubés 30 minutes à -20°C. Les échantillons sont centrifugés 10 minutes, 12 000xg et à 4°C. Les culots sont repris dans le tampon DIGE (7M urée, 2M Thiourée, 4% CHAPS, 30 mM Tris) pour avoir une concentration comprise entre 5 et 6 µg/µL (soit environ 25 µL). Les échantillons sont incubés sur la nuit à -80°C puis mélangés. Après une centrifugation de 10 minutes, 12 000xg à 4°C, les surnageants sont transférés dans un nouveau tube et conservés à -80°C. Les échantillons sont dosés en triplicat.

Le dosage des protéines est réalisé avec le FluoroProfile Protein Quantification selon le protocole du fournisseur (réf. FP0010, Sigma). Un volume d'échantillon est incubé pendant 30 minutes en présence d'un volume de réactif. Le réactif fluorescent est excité à 390 nm et émet à 610 nm. La fluorescence est mesurée avec le POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, Champigny s/Marne, France).

Le marquage est réalisé avec le kit « CyDye DIGE Fluors minimal dyes for Ettan DIGE » selon le protocole du fournisseur (GE Healthcare). Les échantillons sont tous rapportés à la même concentration et 40 µg sont marqués avec des fluorochromes différents (Cyanines Cy3 et Cy5). Un standard interne est réalisé avec 20 µg de protéine de chaque échantillon, il est marqué avec la cyanine Cy2. De plus, chaque réplicat biologique est marqué avec un fluorochrome différent afin de croiser les gels. Par exemple, 2 échantillons de CSMs sont marqués avec la cyanine Cy3 et 2 échantillons avec la cyanine Cy5.

6.2. L'électrophorèse bi-dimensionnelle

La première séparation des protéines est réalisée par isofocalisation (IEF) sur les gels Immobiline DryStrip pH3-11NL (Amersham Biosciences, ref. 17-6003-76). Dans un premier temps, les gels sont réhydratés sur la nuit en présence de tampon de réhydratation (tampon DIGE + 1% DTT + 1% d'ampholytes ou IPG buffer, 0.002% bleu de bromophénol) selon le protocole du fournisseur (GE Healthcare).

Les gels sont rincés avec de l'eau MilliQ puis déposés sur la plaque en céramique ETTAN IPGphor3. Les échantillons sont mélangés volume à volume au tampon DIGE supplémenté de 2% ampholytes et de 2% DTT (soit 1% final de chaque). Les échantillons sont chargés sur les gels puis la migration est réalisée sur la nuit selon le programme suivant (tableau 15).

Etapes		Voltage	Voltage/h	durée
S1	Gradient	150 V	250 V/h	3h
S2	Gradient	300 V	450 V/h	2h
S3	Gradient	1 000 V	3 900 V/h	6h
S4	Gradient	10 000 V	5 500 V/h	1h
S5	Step	10 000 V	30 000 V/h	3h
S6	Step	0 V	0 V/h	∞

Tableau 14 : Etapes de l'isofocalisation de la première dimension

Une incubation de 15 minutes dans un tampon d'équilibration contenant 1 % DTT permet la rupture des ponts disulfures. Une seconde incubation de 10 minutes dans le tampon d'équilibration additionné de 2, 5 % Iodoacétamide permet l'alkylation des groupements SH afin d'éviter l'inter-reformation des ponts disulfures. Les protéines migrent alors en fonction de leur poids moléculaires et leur conformation ne module pas leur séparation.

La petite plaque de verre est enduite d'une solution de Bind Silane (Ethanol 8 mL, Acide acétique 200 μ L, Bind Silane 10 μ L, H₂O MilliQ) et incubée pendant 3h à température ambiante. L'ensemble des plaques est nettoyé à l'éthanol puis le montage des gels est réalisé dans l'ETTAN DALTsix gel caster (GE Healthcare). Le gel (Acrylamide 12, 5 %, 0, 375M Tris HCl pH 8, 8, SDS 0, 1%, APS 0, 1%, Temed 0, 1%, eau MilliQ) polymérise sur la nuit), aplani avec du butanol.

Le butanol est retiré, le gel est rincé avec de l'eau puis avec du tampon de migration. La première dimension est alors déposée au dessus du gel et les bulles sont éliminées (Figure). Une fois positionnée, le tampon de migration est retiré afin d'éviter une migration précoce des échantillons, puis le marqueur de poids moléculaire est déposé et de l'agarose est alors ajouté.

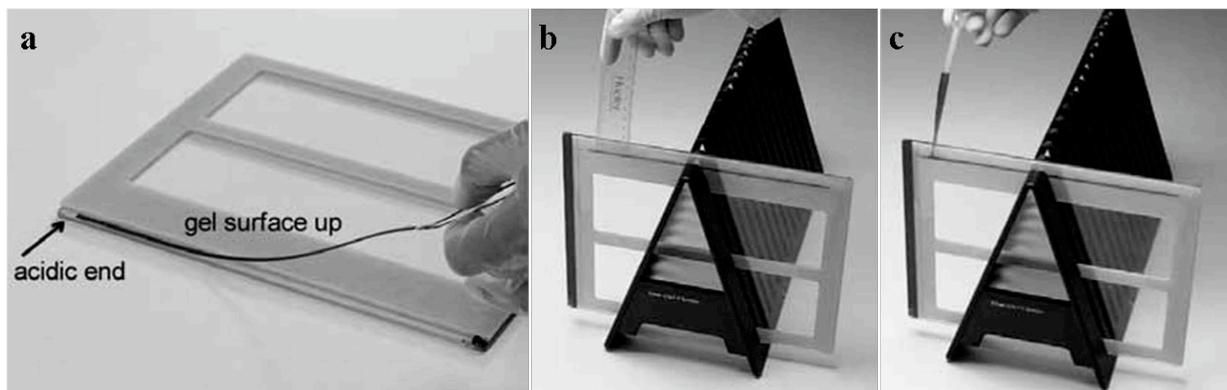


Figure 2: Montage de la seconde dimension (a) Positionner la bande pH3-11NL sur le gel, (b) Supprimer les bulles, (c) Couvrir d'agarose

Les gels sont placés dans la cuve où les niveaux du tampon de migration sont ajustés. La migration débute à 35 W jusqu'à l'entrée des échantillons dans le gel puis elle est augmentée à 100 W. Une fois la migration finie, les gels sont placés dans du tampon de migration jusqu'à leur analyse.

6.3. Analyse de l'électrophorèse bi-dimensionnelle

Les plaques sont préalablement lavées à l'éthanol pour éliminer toutes les poussières saturant l'image. Les gels sont scannés avec le logiciel Ettan DIGE Imager (GE Healthcare). Une fois scannés, les gels sont fixés dans un bain méthanol 50% / acide acétique 7% sur 72 heures.

L'analyse des gels est réalisée avec le logiciel Progenesis same spots. Dans un premier temps, les gels sont alignés et les spots dont l'aire est inférieure à 100 microns sont éliminés. Dans un second temps, les profils d'expression des protéines des différents échantillons sont analysés et comparés (Figure 3). Les spots différentiels possèdent les statistiques suivantes : Anova < 0,05, Fold > 1,3, Q-value < 0,01 et Power > 0,8.

6.4. Piquage des spots d'intérêt

Les zones d'intérêts sont réalignées sur l'image obtenue avec l'Ettan DIGE Imager pour l'ensemble des gels à piquer. Les coordonnées de chaque zone sont enregistrées pour chaque

gel dans une liste de piquage spécifique à chaque gel. Trois gels sont piqués avec l'Ettan™ Spot Picker (GE Healthcare) et les spots sont récupérés en plaque 96 puits. Les spots (3 spots par puits) sont conservés à -20°C jusqu'à leur digestion.

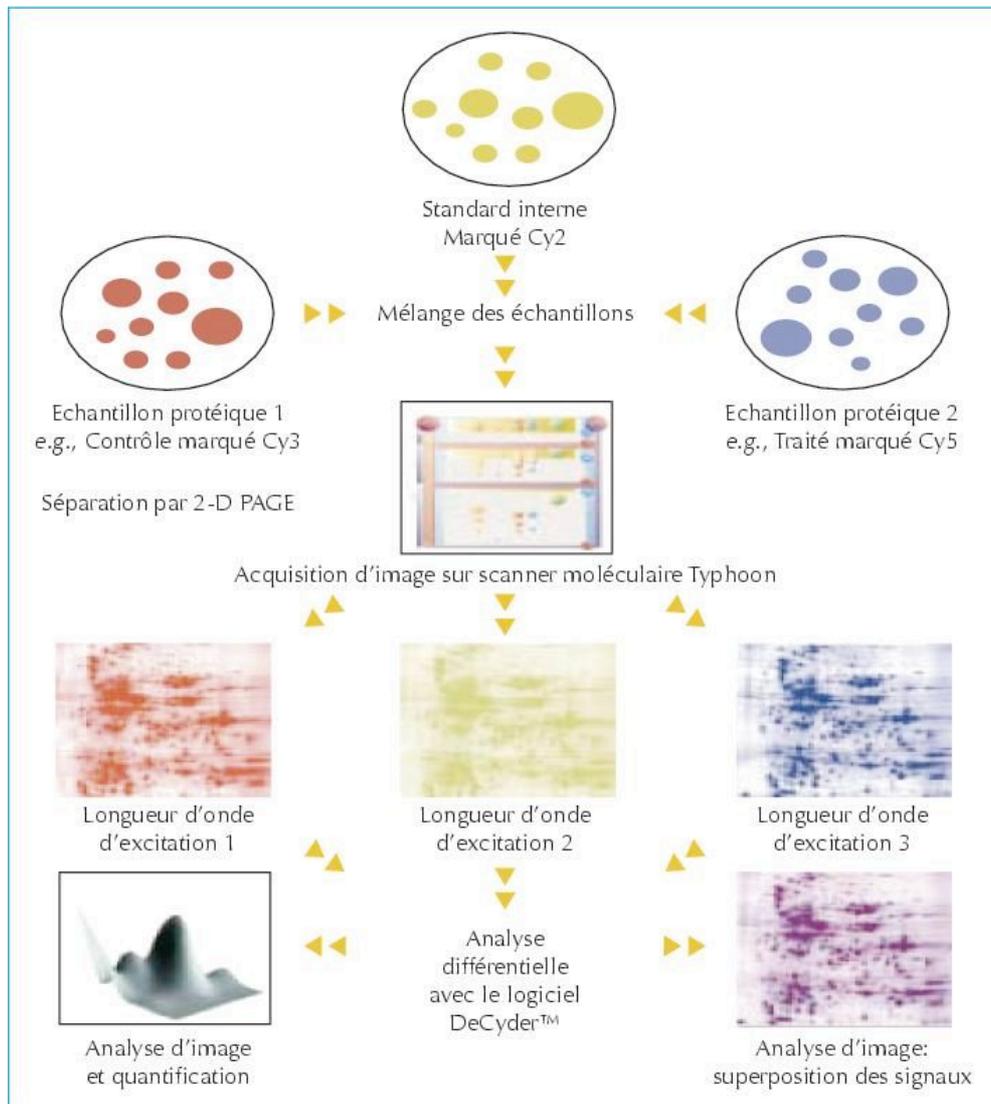


Figure 3 : Analyse des gels.

6.5. Protéolyse et extraction des peptides

Les échantillons sont digérés avec le kit Proteoextract All (Calbiochem) selon le protocole du fournisseur.

L'eau présente dans les puits est retirée à la pipette, les échantillons sont lavés trois fois avec de l'acétonitrile (ACN) puis séchés pendant 15 minutes à 90°C. Les échantillons sont alors réduits dans du tampon de digestion (50mM Bicarbonate d'ammonium pH 7, 8) supplémenté

de DTT (agent réducteur) pendant 10 minutes à 37°C, alkylés avec de l'iodoacétamide (agent bloquant) pendant 10 minutes à température ambiante puis protéolysés sur la nuit avec de la trypsine.

6.6. Chargement des ZipTip et analyse au MALDI-TOF-TOF

Les échantillons sont centrifugés pendant 30 minutes, à 2 500 rpm et à 20°C. Pendant ce temps, la matrice CHICA est préparée à 5 mg/mL dans une solution composée de 50 % d'acétonitrile et 50% de TF 0, 1% puis mélangée jusqu'à sa dissolution totale.

Les colonnes Zip Tip C18 (Millipore, réf #ZTC18M960) sont équilibrées trois fois avec 3 µL d'acétonitrile, puis lavées trois fois avec 3 µL de TF 0, 1%. Les colonnes sont chargées 5 fois avec 3 µL d'échantillon puis lavées 2 fois avec 3 µL de TF 0, 1%. Les peptides fixés sur la colonne sont élués avec la matrice CHICA sur une plaque MALDI Opti-TOF™ 384 well Insert (Applied Biosystems, réf. P/N 1016491).

L'identification des protéines à partir des peptides ainsi obtenus est réalisée par spectrométrie de masse en tandem MS/MS sur le 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems).

6.7. Identification et recherche dans les bases de données

L'identification des protéines par le MALDI TOF/TOF est réalisée avec la base de données "uniprot_sprot 20080818". Les valeurs de pI et de masses moléculaires obtenues avec le MALDI TOF/TOF sont vérifiées avec la base de données d'Expasy Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Cette base de données donne les points isoélectriques et les masses moléculaires théoriques des protéines identifiées.

6.8. Analyse des voies protéiques

Les données protéiques sont chargées dans le logiciel Ingenuity Pathways IPA (Ingenuity systems, Redwood City, CA). La base "Ingenuity Pathways Knowledge Base" (IPKB) est un fichier texte contenant un tableau rempli de nombres d'accès IPI. Les protéines sont chargées et rangées dans les "gene objects" de la base IPKB. A ce moment, les réseaux biologiques sont générés entre nos protéines d'intérêt et leur IPKB. De plus, une analyse fonctionnelle des réseaux donne les fonctions biologiques et/ou les maladies où les protéines sont retrouvées. Les réseaux sont représentés graphiquement sous forme de carte (gènes/produits du gène) et de flèches (les relations biologiques entre les gènes). Toutes les flèches sont soutenues par au

moins une référence dans la littérature, un manuel ou des renseignements canoniques conservés dans l'IPKB. L'analyse calcule également un score pour chaque réseau en fonction de l'ensemble des gènes significatifs utilisés. La significativité de l'enregistrement fonctionnel est calculé avec un test de Fisher. Le score est dérivé d'une valeur-p et indique la probabilité que les gènes dessinés sur la carte du réseau soient retrouvés ensemble en raison de la chance aléatoire $[(p\text{-score}) - \log_{10}(p\text{-value})]$. Finalement, la caractéristique du créateur Path a été d'utilisé pour créer des images réseaux graphiquement riches.

RESULTATS

CHAPITRE I: ETUDES DES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE DANS LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES

AVANT-PROPOS

Les cellules souches adultes sont des progéniteurs cellulaires pluripotents qui contribuent au maintien de l'homéostasie et à la régénération des tissus. En effet, ces cellules possèdent la capacité de s'autorenouveler et de se différencier, assurant ainsi la longévité de la réserve de cellules souches de l'organisme. De plus, le contrôle de l'intégrité de l'ADN est très

important dans les cellules souches car la moindre altération génétique peut avoir des répercussions sur la différenciation. Ces altérations peuvent également interférer avec les propriétés régénératives cellules souches. Ces cellules ont donc tendance à rentrer en sénescence *in vitro* mais aussi *in vivo* afin de diminuer le risque de dérives génétiques. De plus, ces cellules doivent posséder une forte capacité de résistance aux inducteurs de mort cellulaire. Ces cellules sont présentes au sein de microenvironnements protecteurs appelés « niches ». Ces niches apportent les facteurs nécessaires à la survie et au maintien des cellules souches au stade G0 (voir Introduction).

Cependant, de multiples altérations génétiques seraient responsables de la transformation de cellules souches normales en cellules souches cancéreuses (CSCs) au sein même des niches. De plus, de récents travaux sur les glioblastomes suggèrent également que des mutations de multiples gènes au sein même des tumeurs transformeraient des cellules souches adultes en CSCs (Shiras *et coll.*, 2007), elles constitueraient alors des progéniteurs tumoraux (Bao *et al.*, 2006). Les cellules souches cancéreuses peuvent résister à la plupart des thérapies anticancéreuses car elles se divisent rarement. En effet, les thérapies actuelles éliminent principalement les cellules proliférantes de la masse tumorale et non les progéniteurs tumoraux.

Notre objectif est donc de caractériser les mécanismes de mort cellulaire dans les CSCs de tumeurs gliales. Pour cela, nous étudions les mécanismes de résistance des cellules souches et nous cherchons à les sensibiliser aux traitements anti-cancéreux. Dans un premier temps, nous nous intéressons aux cellules souches adultes que sont les cellules souches mésenchymateuses (hCSMs) car leur provenance médullaire facilite leur obtention et leur isolement.

ARTICLE: DECREASED AUTOPHAGY AND ENHANCED APOPTOSIS ACCOMPANY THE IN VITRO EARLY DIFFERENTIATION OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS.

1. Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (hCSMs) utilisées dans l'ensemble des expériences décrites dans ce mémoire ont été isolées à partir d'échantillons de moelle osseuse humaine d'après la méthode décrite par l'équipe de Pittenger (Pittenger *et coll.*, 1999). En effet, elles sont présentes au sein de niches médullaires. Les hCSMs isolées possèdent la capacité à adhérer au plastique (Figure 1A) ainsi que la capacité d'autorenouvellement (Figure 1B).

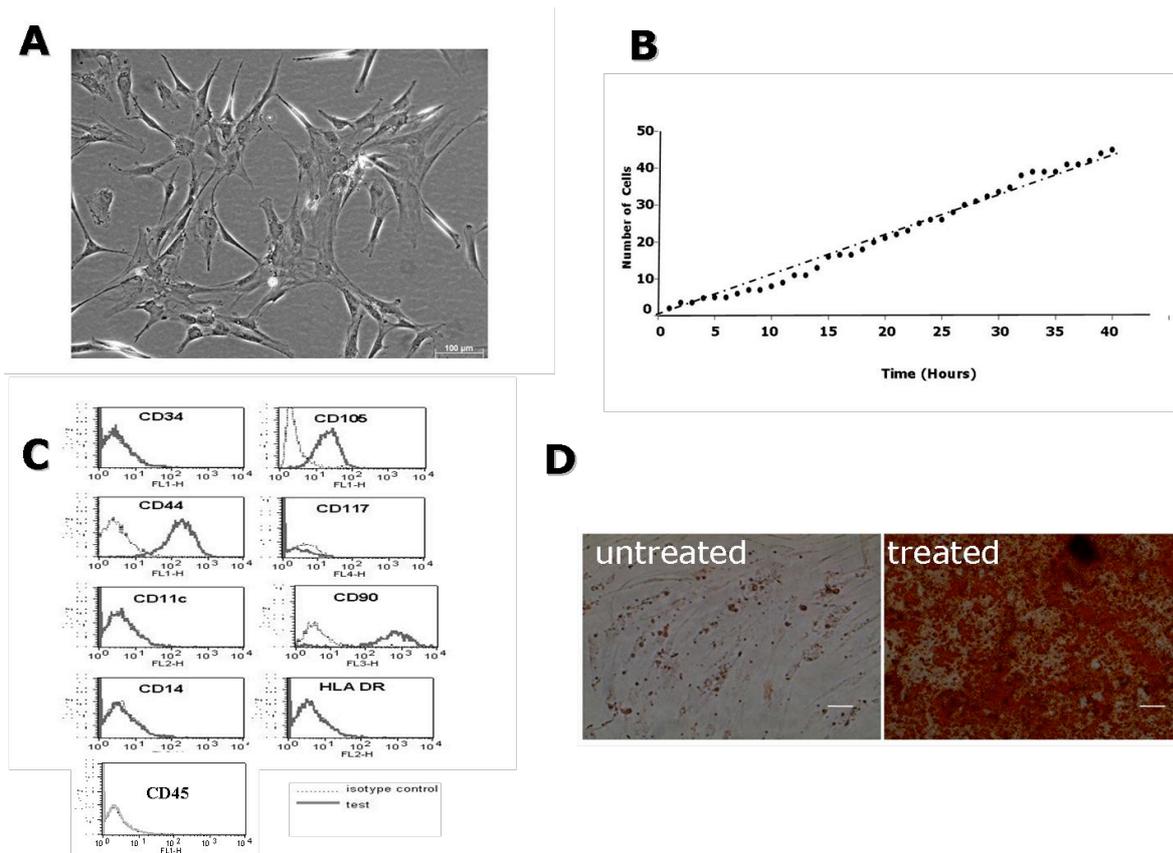


Figure 1 (Figure 1 de l'article) : Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines ou hCSMs utilisées.

(A) L'adhérence cellulaire des hCSMs est étudiée en microscope contraste de phase. (B) La capacité d'autorenouvellement est analysée par time-lapse sur 40h. (C) L'expression des marqueurs de cellules souches et hématopoïétiques est analysé par cytométrie en flux. (D) La capacité de différenciation ostéogénique des hCSMs est visualisée par une coloration Rouge alizarine.

L'analyse par cytométrie en flux de nos hCSMs met en évidence l'expression des marqueurs de cellules souches $CD90^+$, $CD44^+$ et $CD105^+$. De plus, les cellules analysées n'expriment aucun des marqueurs hématopoïétiques $CD45^-$, $CD34^-$, $CD14^-$, $CD117^-$, $CD11c^-$ et $HLA-DR^-$ (Fig 1C). Nos cellules sont également capables de se différencier en ostéoblastes (figure 1D), chondrocytes (figure 2 B) et en préadipocytes (Figure 2C) (Pittenger *et coll.*, 1999). Elles sont également susceptibles de se différencier en cellules neurales et astrocytaires (figures 2C et 2D) (Kopen *et coll.*, 1999) ; Woodbury *et al*, 1999).

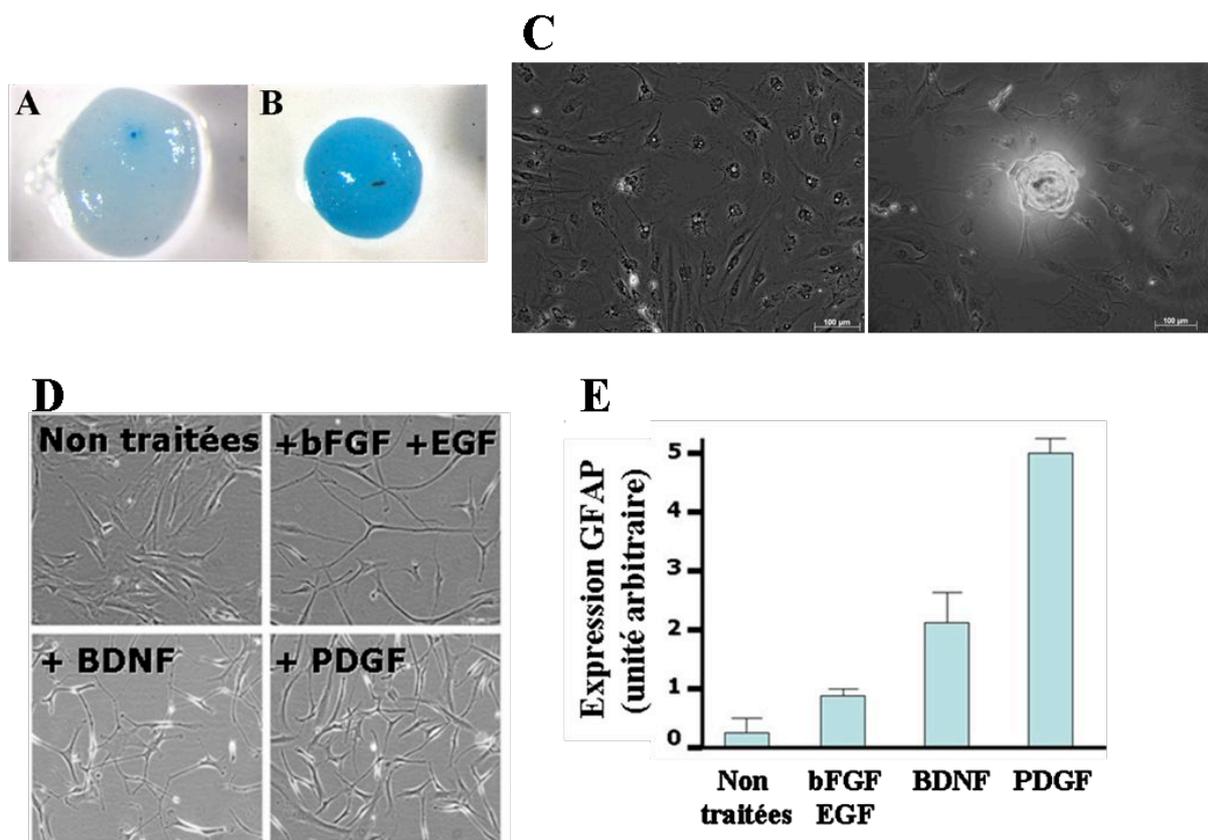


Figure 2 : Analyse des différentes voies de différenciation des cellules souches mésenchymateuses utilisées.

(A et B) Les hCSMs sont ensemencées en micromasses et cultivées sous hypoxie avec 5% d'oxygène puis sont colorées en bleu alcian (A). Les hCSMs non différenciées sont cultivées en milieu DMEM complet. (B) La différenciation chondrogénique est induite par culture des hCSMs en milieu de différenciation chondrogénique (DMEM supplémenté d'ascorbate de sodium, de dexaméthasone de TGF- β 1, d'insuline, de transferrine et de sélénite de sodium). (C) Les cellules sont engagées vers une différenciation adipocytaire en milieu supplémenté en insuline. La coloration Oil Red O permet de visualiser les vacuoles de lipides neutres produits par les adipocytes. (D et E) Les cellules sont engagées vers une différenciation neurale en milieu supplémenté de bFGF et EGF, de BDNF ou de PDGF. La morphologie cellulaire est observée en contraste de phase (D). L'expression du marqueur astrocytaire GFAP est analysée en PCR quantitative (E).

2. Etude de la sensibilité à l'apoptose des hCSMs non différenciées

Les hCSMs sont décrites comme étant résistantes aux traitements apoptotiques induits par chimiothérapie (Li *et coll.*, 2004 ; Mueller *et coll.*, 2006), mais les mécanismes de résistance de ces cellules ne sont pas encore déterminés. Ainsi, nous avons étudié dans un premier temps la sensibilité des hCSMs non différenciées envers différents stimuli apoptotiques. Tout d'abord, nous avons cherché à déclencher une réponse mitochondriale avec l'utilisation de différents traitements comme la 3-MA (3-MethylAdenine) et la staurosporine (STS), inhibiteur à large spectre des kinases. Cette drogue est un inhibiteur non spécifique des protéines kinases C et elle augmente également la concentration intracellulaire du calcium

ainsi que celle des ROS, permettant ainsi le relargage de cytochrome c (Liu *et coll.*, 2004). La réponse mitochondriale peut également être induite par des dommages à l'ADN avec l'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II) et les ultra-violets (UV).

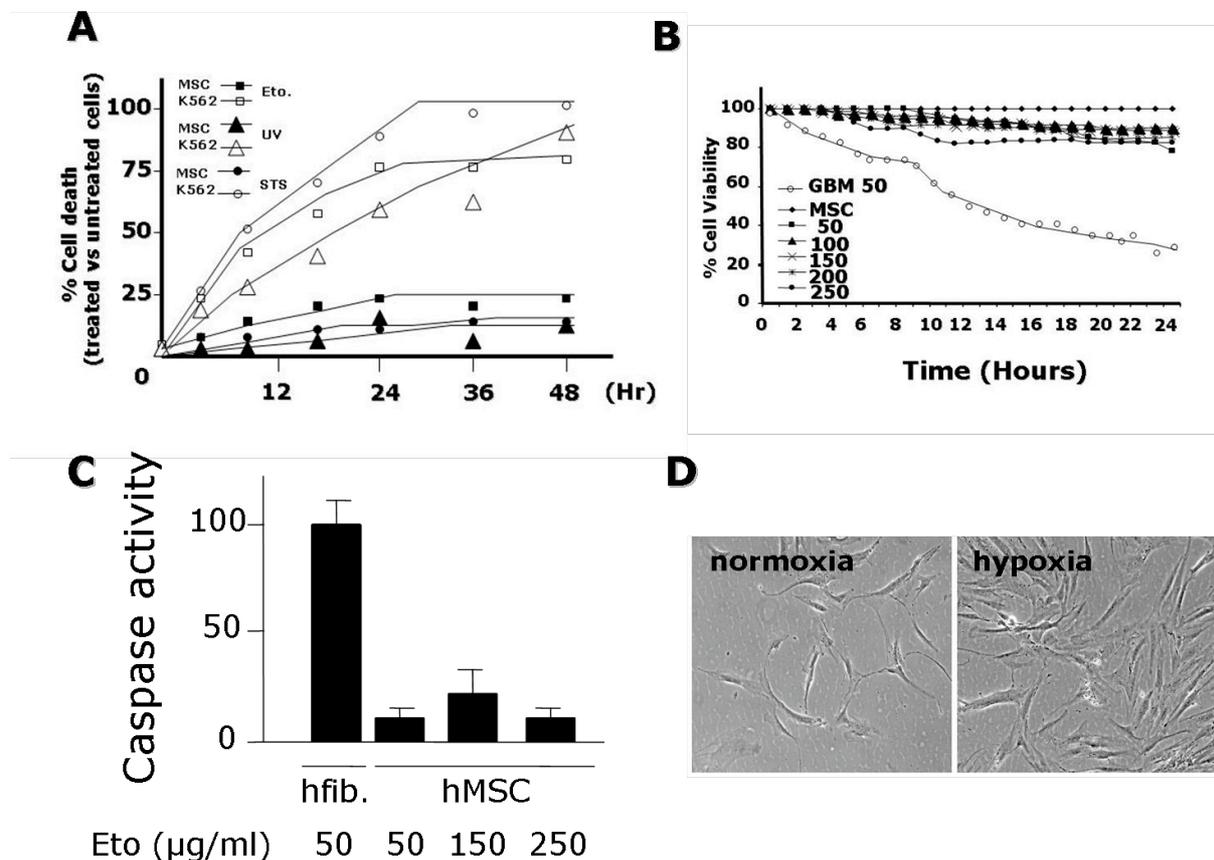


Figure 3 (Figure 2 de l'article) : Etude de la sensibilité à l'apoptose des hCSMs non différenciées.

L'induction de la mort des cellules K562 et des CSMs par traitement à l'étoposide, à la staurosporine ou les UV est analysé par time-lapse(A) tout comme l'effet du ligand soluble FasL sur les CSMs (B). (C) Mesure de l'activité Caspase sur des cellules traitées avec une dose croissante d'Etoposide. (D) Effet de l'hypoxie (5% d'O₂) sur la survie des CSMs.

Comme le montre la figure 3A, les hCSMs sont résistantes à l'ensemble des stimuli utilisés car aucun des traitements n'induit de mort significative dans ces cellules. A l'inverse, la lignée cellulaire d'érythroleucémie K562 est sensible à l'ensemble des traitements utilisés (figure 3A). Les hCSMs sont donc résistantes à l'apoptose dite mitochondriale. Les hCSMs s'avèrent également résistantes à l'apoptose déclenchée par la voie extrinsèque. En effet, un traitement avec le ligand soluble de Fas (FasL) n'induit pas d'apoptose sur les hCSMs, contrairement aux cellules de gliomes (figure 3B). De plus, les traitements apoptotiques n'induisent pas d'activation de la Caspase-3 dans les hCSMs (Figure 3C). Par ailleurs, une hypoxie sous 5% d'O₂ n'induit pas de mort cellulaire pour les hCSMs (Figure 3D) mais

stimule leur prolifération (Figure 3D). Les hCSMs sont donc résistantes à l'ensemble des stimuli et ne peuvent déclencher de mort cellulaire par apoptose.

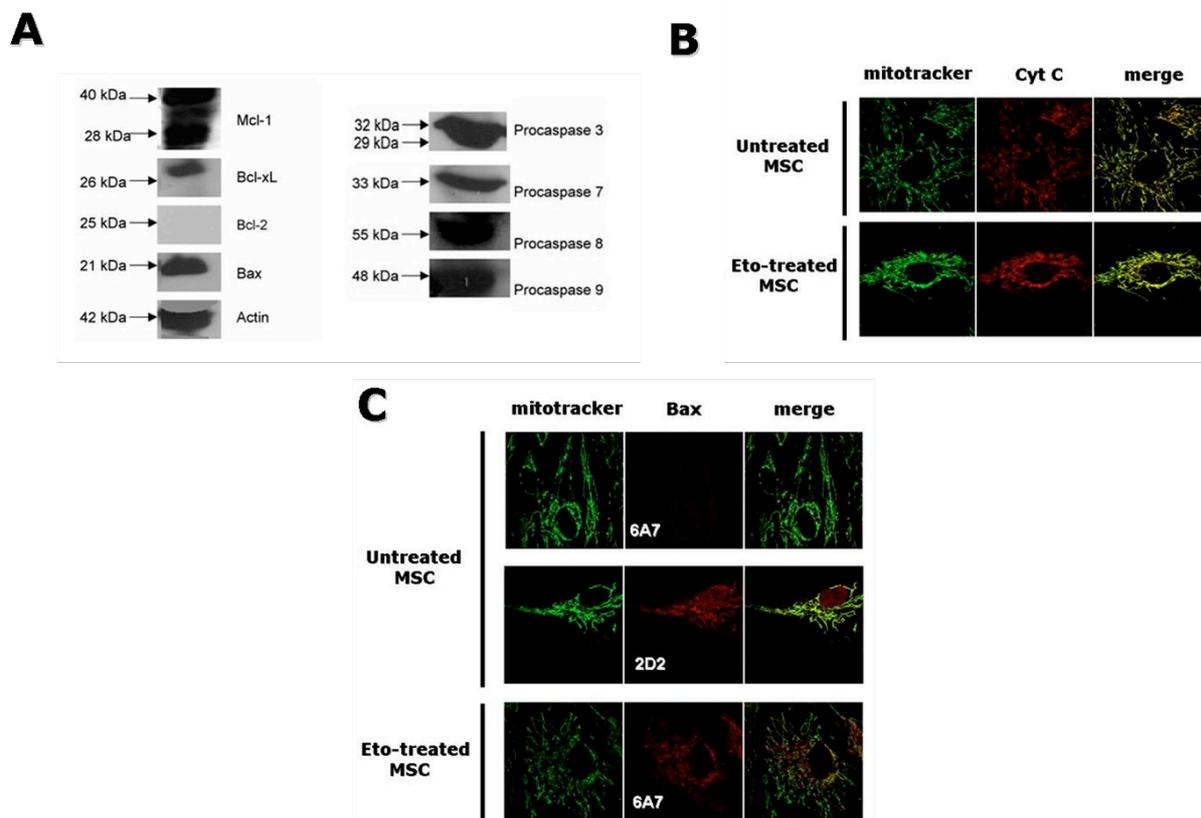


Figure 4 (Figure 3 de l'article) : Etude des protéines de la famille de Bcl-2 dans les hCSMs au cours de l'apoptose.

Cependant, l'analyse par immunoempreinte montre que les hCSMs expriment l'ensemble des facteurs clés de l'apoptose mitochondriale. En effet, ces cellules expriment les protéines de la famille de Bcl-2 contrôlant la phase initiatrice de l'apoptose (voir introduction) comme les membres anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 ainsi que la protéine pro-apoptotique Bax (Figure 4A). De plus, les cellules expriment aussi les protéines essentielles à la phase effectrice de l'apoptose, les caspases-3, -7, -8 et -9 (Figure 4A). Cependant, les hCSMs ne semblent pas exprimer la protéine Bcl-2 dans ces conditions (Figure 4A).

Afin de comprendre les mécanismes de résistance à l'apoptose de ces cellules, les différentes étapes de l'apoptose sont analysées. En effet, lors d'un stimulus apoptotique, les protéines à domaine BH3-seul déplacent les membres antiapoptotiques et libèrent ainsi les membres pro-apoptotiques, comme Bax, de complexes protecteurs. Il y a alors une relocalisation de Bax du

cytosol vers la mitochondrie. Une fois insérée dans cet organelle, la protéine change de conformation et permet la libération du cytochrome c de la mitochondrie (voir introduction). L'analyse immunocytochimique des hCSMs traitées à l'étoposide met en évidence l'insertion de Bax dans la mitochondrie (anticorps anti-Bax, épitope 2D2) ainsi que son changement de conformation par l'utilisation d'un anticorps spécifique à la conformation active de Bax (anticorps anti-Bax, épitope 6A7 ; Figure 4C). Or, il n'y a pas de relargage de cytochrome c dans les hCSMs traitées à l'étoposide (figure 4B). Ces résultats suggèrent alors que le relargage mitochondrial est l'étape limitante de l'apoptose dans les hCSMs.

3. Etude de la sensibilité à l'apoptose des hCSMs différenciées

Nous avons alors cherché à sensibiliser les hCSMs à l'apoptose en les engageant dans une voie de différenciation. En effet, les cellules souches mésenchymateuses peuvent s'engager dans de nombreuses voies cellulaires tels que les voies chondrocytaire, adipocytaire, ostéoblastique mais également les voies neurale et astrocytaire (Montesinos *et coll.*, 2009 ; Woodbury *et coll.*, 2000).

Dans un premier temps, les hCSMs sont engagées dans la voie ostéogénique puis la mortalité cellulaire est analysée par un test d'exclusion au bleu trypan. Nous observons alors que les cellules acquièrent une sensibilité aux stimuli apoptotiques dès l'initiation de la différenciation. En effet, la mortalité cellulaire après traitement à l'étoposide est de 25% dès une semaine de différenciation (Figure 5A), de 80% après 2 semaines puis 90% après 3 semaines de différenciation (Figure 5A). Même si la différenciation ostéogénique induit une faible mortalité cellulaire après 2 semaines (<30%), cette dernière est non significative par rapport à la mortalité induite par le traitement à l'étoposide (80%) (Figure 5A).

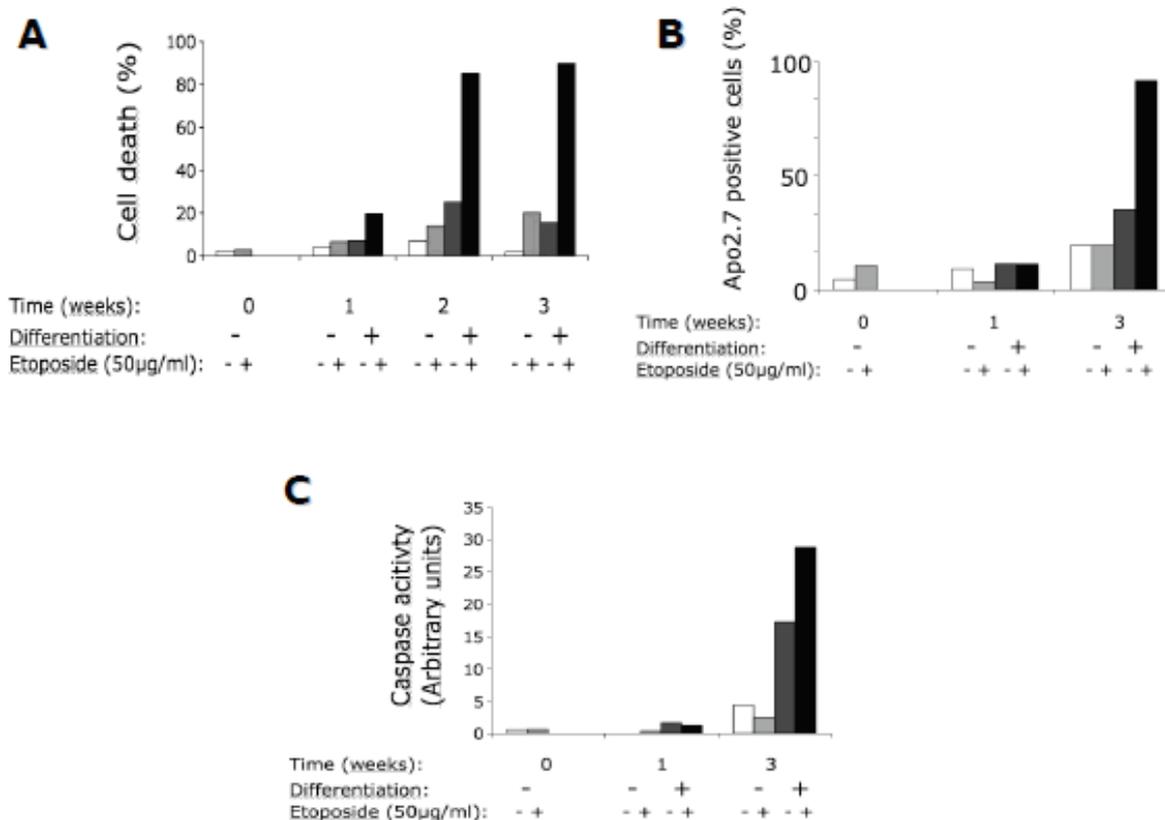


Figure 5 (Figure 4 de l'article) : Etude de la sensibilité à l'apoptose des hCSMs au cours de la différenciation ostéogénique

(A) Analyse de la mortalité cellulaire par Bleu Trypan après traitement de 24h des hCSMs au cours de la différenciation ostéogénique avec de l'étoposide 50 µM. (B et C) Analyse au FACS de marqueurs de l'apoptose que sont l'Apo2.7 (B) et la Caspase-3 active (C).

Cependant, le test d'exclusion au bleu trypan ne permet pas de déterminer le type de mort induit par l'étoposide. Ainsi, afin d'étudier l'induction de l'apoptose dans ces cellules, nous analysons l'expression de marqueurs spécifiques de l'apoptose que sont la Caspase-3 active (Figure 5B) et la protéine mitochondriale Apo2.7 par cytométrie en flux (Figure 5C). Malgré la sensibilité de ces cellules au traitement étoposide après une semaine de différenciation (mortalité de 25%), l'analyse des marqueurs apoptotiques indique que les cellules ne déclenchent pas l'apoptose. A l'inverse, les hCSMs sont capables de déclencher une réponse apoptotique dès 2 semaines de différenciation ostéogénique avec 30% de cellules Caspase-3 active et 12% de cellules positives pour la protéine Apo2.7. La différence entre ces 2 marqueurs de l'apoptose réside dans le fait que le marquage Apo2.7 a été réalisé sans perméabilisation des cellules. Dans ce cas, l'Apo2.7 devient un marqueur tardif d'apoptose. Si nous avions perméabilisés nos cellules, nous aurions sans doute obtenus les mêmes résultats.

La sensibilisation à l'apoptose des hCSMs est également observée lors de la différenciation adipocytaire. Les cellules sont cultivées pendant 3 semaines en présence ou pas d'insuline afin d'obtenir des préadipocytes. Une coloration Oil Red O permet alors de visualiser les vacuoles de lipides neutres produits par les adipocytes (Figure 6A). Les cellules sont alors traitées avec de l'étoposide à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

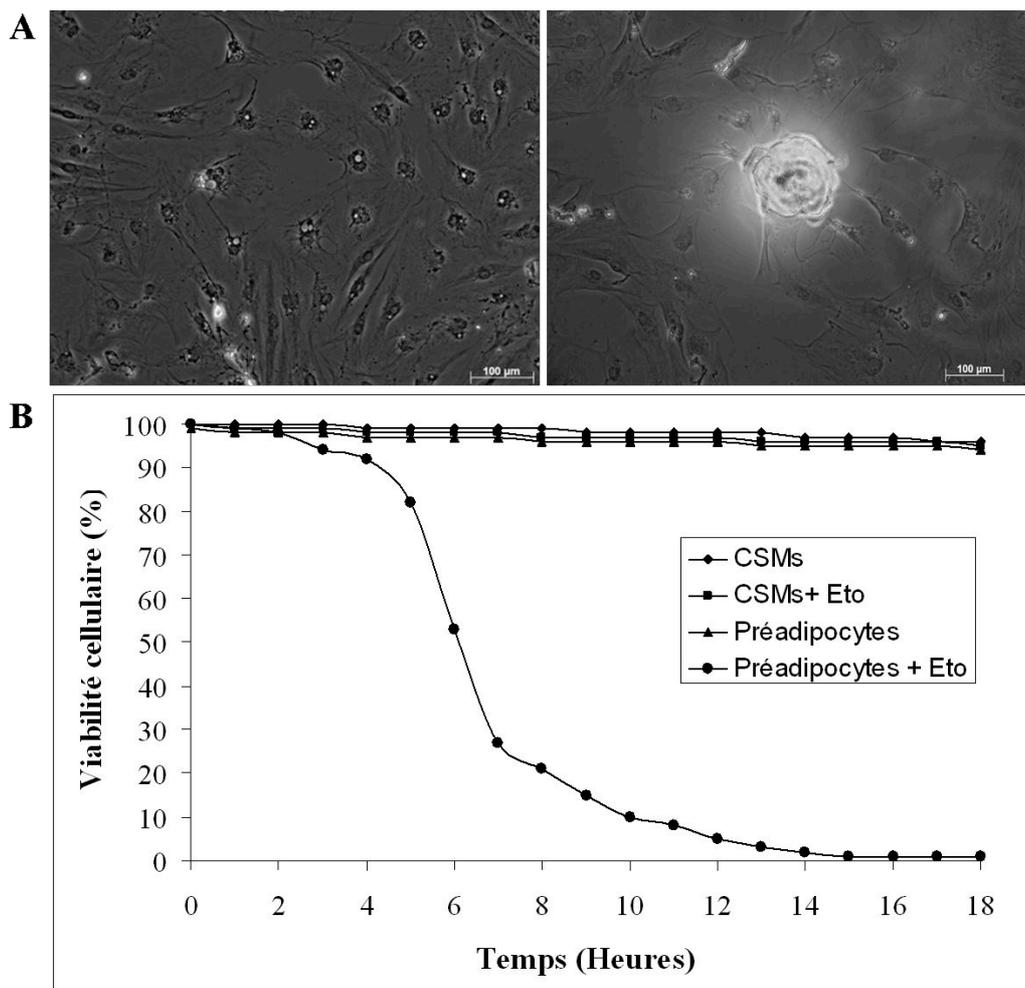


Figure 6 : Sensibilisation à l'apoptose des hCSMs au cours de la différenciation adipocytaire.

Les cellules sont cultivées pendant 3 semaines en milieu supplémenté ou pas d'insuline afin de les engager vers une différenciation adipocytaire. **(A)** Une coloration Oil Red O permet de visualiser les vacuoles de lipides neutres produits par les CSMs non différenciées (à gauche) et par les adipocytes (à droite). **(B)** La sensibilité des cellules différenciées est analysée par mesure de la viabilité après traitement à l'étoposide 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Une fois engagées dans la voie adipocytaire, les hCSMs deviennent alors sensibles à l'étoposide. En effet, les préadipocytes traités à l'étoposide présentent une très forte mortalité (99%) après 18h à l'inverse des cellules non différenciées (Figure 6B).

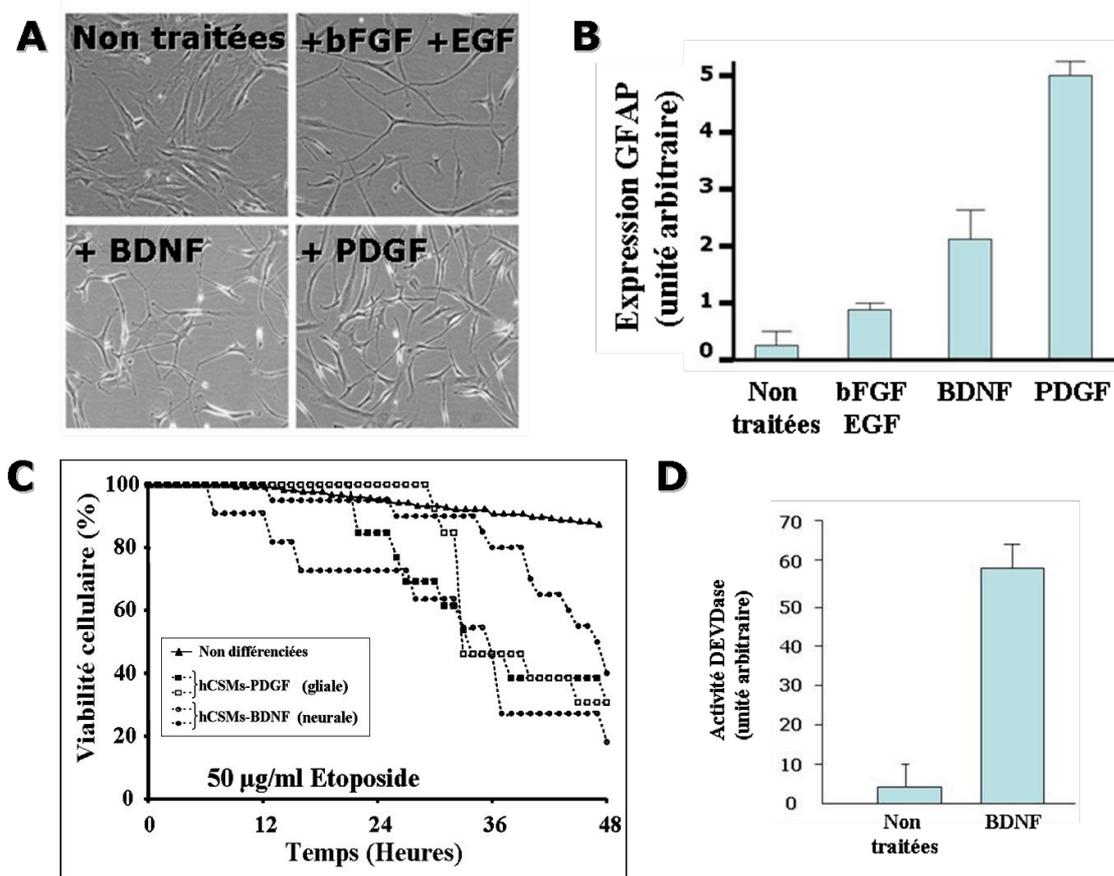


Figure 7 : Sensibilisation à l'apoptose des hCSMs au cours de la différenciation neuronale.

Les cellules sont cultivées en milieu complet supplémenté ou pas en bFGF et EGF, BDNF ou PDGF. La morphologie cellulaire est observée en contraste de phase (A). L'expression du marqueur astrocytaire GFAP est analysée en PCR quantitative (B). La sensibilité des cellules différenciées est analysée par mesure de la viabilité après traitement à l'étoposide 50 µg/mL (C). L'activité Caspase-3 de ces cellules traitées est mesurée par fluorométrie (D).

La sensibilisation à l'apoptose des hCSMs est également observée lors de la différenciation neuronale. Les hCSMs sont alors différenciées en présence de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et d'EGF (Epidermal Growth Factor), de BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) ou de PDGF (Platelet-derived growth factor). Même si aucune modification morphologique n'est observée (Figure 7A), l'expression du marqueur de différenciation astrocytaire GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) en PCR quantitative augmente pour les cellules traitées avec le BDNF et le PDGF (Figure 7B). Une fois engagées dans la voie astrocytaire, les hCSMs

deviennent alors sensibles à l'étoposide, à l'inverse des cellules non différenciées (Figure 7C). De plus, il y a une forte activité de la Caspase-3 dans les cellules différenciées après traitement à l'étoposide (Figure 7D). Ainsi, la diminution de la viabilité cellulaire est due à l'activation de l'apoptose.

Les hCSMs acquièrent donc une sensibilité à l'apoptose dès qu'elles sont engagées dans une voie de différenciation.

4. Réparations des dommages à l'ADN

Lorsque des cassures surviennent au niveau de l'ADN, le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) est recruté au site d'ADN endommagé et recrute à son tour la protéine ATM (Uziel *et coll.*, 2003 ; Lee et Paull, 2005). Celle-ci, présente normalement dans la cellule sous forme de dimère inactif, s'auto-phosphoryle entraînant une dédimérisation et son activation. ATM permet alors de réparer les cassures double-brins dans l'ADN survenant lors d'une agression physique tel des radiations ionisantes via l'activation de deux mécanismes : la recombinaison homologue entre deux molécules sœurs d'ADN et la jonction non homologue des brins brisés (NHEJ). Ces mécanismes sont induits par l'activation de plusieurs substrats d'ATM : Chk1 et Chk2 activant les points de contrôle du cycle cellulaire, c-Abl activant le processus de recombinaison homologue, BRAC1, qui est impliqué dans la réparation d'ADN et p53, un facteur de transcription activant des gènes de réparation d'ADN, d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose.

Cependant, dans un premier temps, ATM doit phosphoryler l'histone H2AX alors appelée γ H2AX (Tanaka *et coll.*, 2006). En effet, c'est l' γ H2AX qui recrute au niveau des dommages de l'ADN toutes les protéines nécessaires à la réparation de l'ADN dont p53, BRAC1, Chk1 et Chk2. Ces substrats d'ATM vont ensuite induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation des points de contrôle, deux processus qui vont permettre la réparation de l'ADN endommagé. Si l'ADN est irréparable, des processus d'apoptose ATM-dépendants vont être activés pour éviter que la cellule survive (Lavin et Kozlov, 2007).

La visualisation de la formation des foci γ H2AX est donc un bon indicateur des dommages à l'ADN. Leur présence indique les dommages à l'ADN et leur disparition au cours du temps met en évidence la réparation de ces dommages.

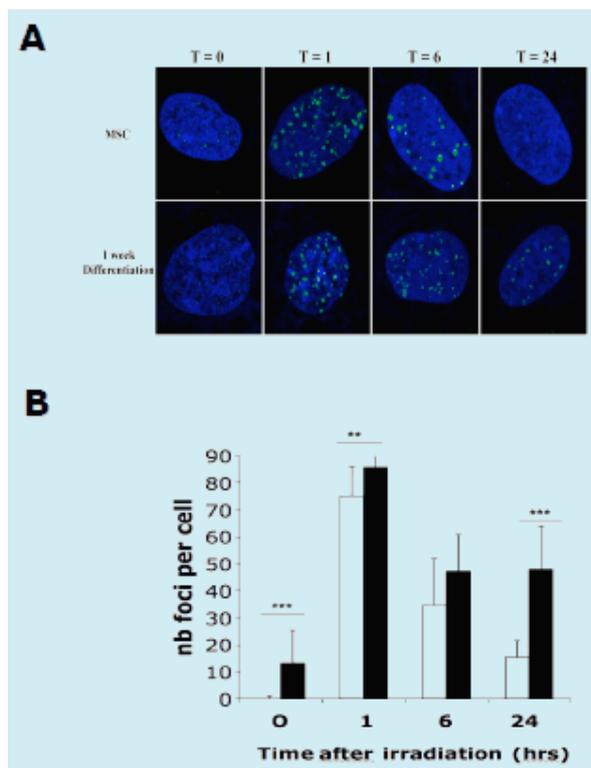


Figure 8 (Figure 5 de l'article) : Capacité de réparation des dommages à l'ADN des CSMs.

Les CSMs sont cultivées en milieu DMEM complet ou en milieu de différenciation ostéogénique pendant 1 semaine puis elles sont ensuite irradiées avec 5 Gy. (A) Une cinétique du marquage γ -H2AX est réalisée à 0h, 1h, 6h et 24h après l'irradiation. Le noyau est marqué au DRAQ5. (B) Le nombre de foci γ -H2AX est quantifié par une analyse avec le logiciel Blobfinder.

Afin de comprendre comment ces cellules deviennent sensibles à la mort cellulaire au cours de leur différenciation, nous nous sommes intéressés à la capacité de réponse aux dommages à l'ADN de ces cellules. Pour cela, les cellules sont irradiées avec 5 Gy avec un irradiateur Faxitron X-Ray LCC (Eimex, Le Plessis Grammorie, France). Les effets à long-terme de la réparation à l'ADN sur ces cellules sont analysés par observation de la formation des foci γ H2AX dans des hCSMs non différenciées et des cellules ayant subi une semaine de différenciation ostéogénique (figure 8A). Les foci γ H2AX sont visibles 1h après l'irradiation et le nombre de foci diminue au cours du temps après l'irradiation (figure 8B). Cependant, la diminution est plus forte dans les hCSMs non différenciées que dans les cellules différenciées. Ainsi, les hCSMs possèdent une meilleure capacité de réparation des dommages à l'ADN. Ces résultats suggèrent alors que l'augmentation de la sensibilité à l'apoptose des cellules en cours de différenciation est liée à la diminution de leur capacité de réparation des dommages à l'ADN, comme décrit précédemment pour les cellules souches âgées (Yilmaz et Morrison, 2008).

5. Etude de l'activité autophagique des hCSMs non différenciées et différenciées

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la mort cellulaire de type II ou macroautophagie. A l'origine, l'autophagie a été décrite comme étant un processus de survie face à une carence nutritive (Boya *et coll.*, 2005 ; Lum *et coll.*, 2005). De plus, l'autophagie est constitutive dans certains tissus où elle assure le renouvellement des composants cellulaires endommagés (voir introduction). Ce processus dynamique permet la séquestration de protéines cellulaire et d'organelles dans des vésicules spécialisées, les autophagosomes. Ces vésicules sont caractérisées par la présence d'une double membrane. Les autophagosomes vont fusionner avec des lysosomes afin de recycler leur contenu (voir introduction). Cependant, une autodigestion trop importante des cellules conduit à leur mort, appelée mort cellulaire de type II, en opposition à l'apoptose qui la mort cellulaire de type I.

L'analyse de l'autophagie est réalisée par 4 techniques distinctes : la microscopie électronique, le clivage de la protéine LC3 (Atg8), le marquage MDH et la dégradation des protéines à longue durée de vie.

La formation des autophagosomes est visualisable par les 3 premières techniques citées précédemment. La microscopie électronique à transmission met en évidence les vacuoles à doubles membranes, les autophagosomes et les autophagolysosomes. Les autophagosomes peuvent être également visualisés par le monodansylpentane (MDH), autre marqueur de l'autophagie (Niemann *et coll.*, 2001). Au cours de la formation de ces autophagosomes, la protéine LC3-I est insérée dans les doubles membranes où elle sera clivée en LC3-II au cours de la maturation des autophagosomes. Ainsi, le profil d'expression de LC3 traduit l'activité autophagique. En effet, si seule LC3-I est observée, il n'y a pas d'autophagie. A l'inverse, la présence de LC3-II traduit une activité autophagique.

Une autre caractéristique de l'autophagie est la dégradation des protéines à longue durée de vie les autres étant dégradées par le protéasome. Afin de mesurer cette capacité de dégradation, les cellules sont incubées en présence de L-[¹⁴C]valine pendant 24h afin de marquer les protéines néosynthétisées. Une préchasse d'une heure est réalisée dans un milieu complet en présence d'excès de L-valine non radiomarquée afin d'éliminer du dosage la dégradation des protéines à renouvellement rapide. Une carence nutritive est alors réalisée en présence d'excès de valine non radiomarquée. Après 6h de traitement, la quantité d'acides

aminés libres radiomarqués présents dans le surnageant est rapportée à la radioactivité totale. Ce ratio traduit la capacité autophagique des cellules.

La microscopie électronique met en évidence la présence de vacuoles dans les hCSMs cultivées en conditions normales (Figure 9A). Cependant, le nombre et la taille de ces vacuoles dans les hCSMs augmentent lors d'une carence nutritive (Figure 9A). Ces résultats sont confirmés par le marquage MDH des autophagosomes. En effet, les autophagosomes sont également présents dans les hCSMs en conditions normales et ce marquage augmente lors de la carence nutritive (Figure 9C).

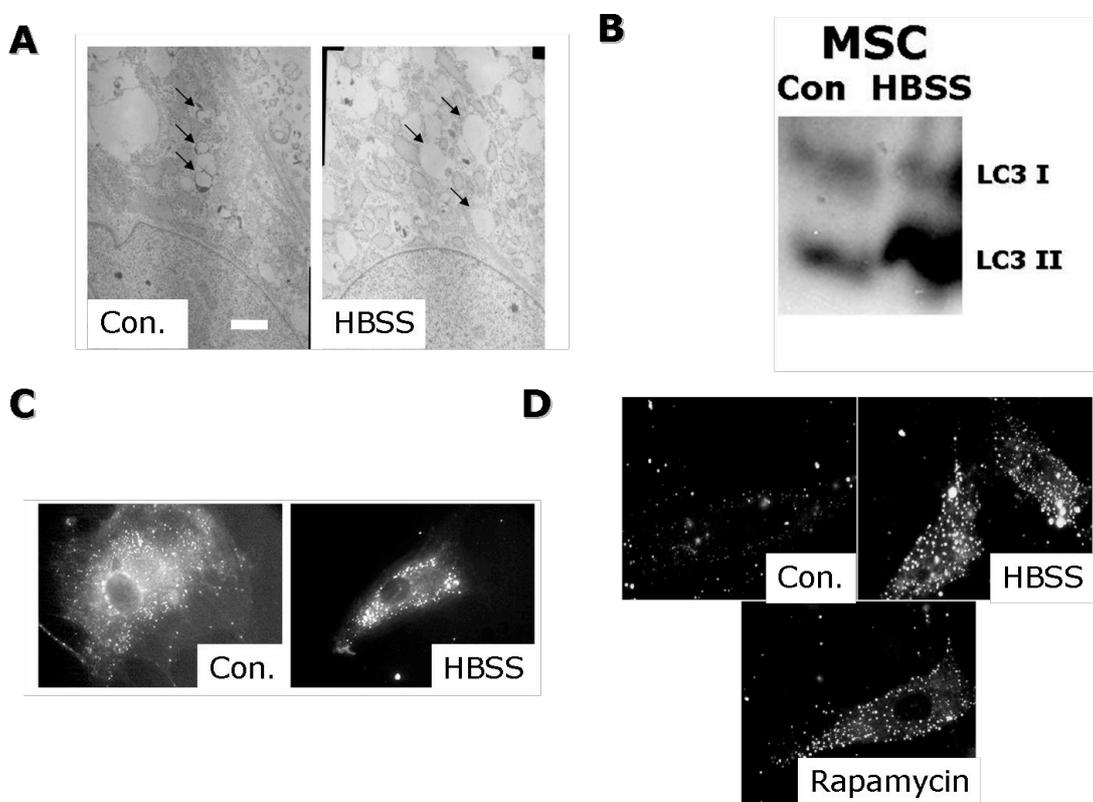


Figure 9 (Figure 6 de l'article) : Etude de la réponse autophagique dans les hCSMs non différenciée en milieu complet ou lors d'une carence nutritive (HBSS).

Les doubles membranes des autophagolysosomes sont visualisées par MET (A). Le clivage de LC3 est analysé par immunoempreinte (B). Les vacuoles autophagiques sont visualisées par marquage au MDH (C et D).

Afin de vérifier que les vacuoles observées sont autophagiques, le profil d'expression de la protéine LC3 est analysé par immunoempreinte. En effet, le clivage de cette protéine est l'une des caractéristiques de l'autophagie. Les hCSMs cultivées en conditions normales possèdent les formes LC3-I et LC3-II, la dernière étant couramment associée à l'activité. Ces résultats

indiquent donc la présence d'une activité autophagique basale (Figure 9B). Cette activité autophagique accroit lors d'une carence nutritive, ce qui se traduit par une augmentation de la forme clivée LC3-II (Figure 9B). De plus, dans les hCSMs, l'autophagie est un processus de survie cellulaire. En effet, après 48h de carence nutritive, les hCSMs sont capables de proliférer en milieu complet.

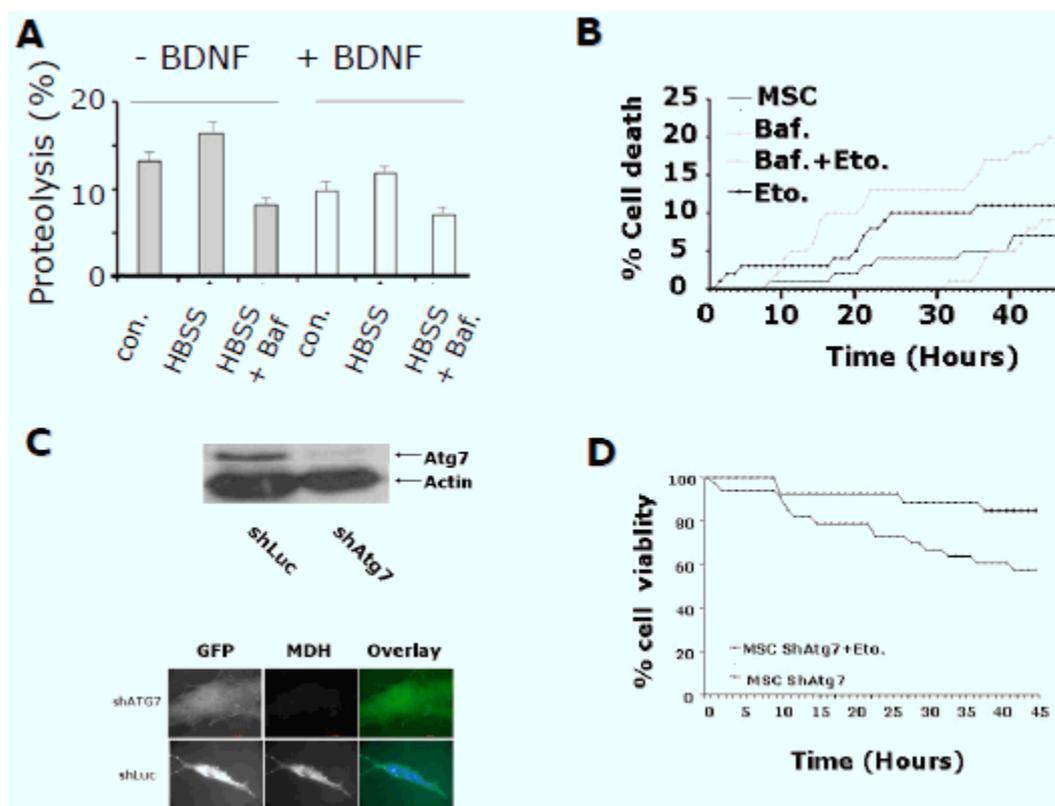


Figure 10(Figure 7 de l'article) : Effets de la différenciation sur l'activité autophagique et importance de l'autophagie dans la survie des hCSMs.

La capacité autophagique des cellules est mesurée par protéolyse (A). Les effets de l'inhibition de l'autophagie par la Bafilomycine A1 (Baf) et/ou du traitement à l'étoposide sur la survie des hCSMs sont analysés au time-lapse (B). L'importance de l'autophagie sur la survie des CSMs est étudiée par une approche lentivirale de shRNA dirigé contre la protéine Atg7. Les cellules sont cultivées en carence nutritive pendant 6h puis subissent un marquage MDH (C). La survie des cellules shAtg7 traitées ou pas avec de l'étoposide est analysée en time-lapse (D).

Cependant, lorsque les cellules sont engagées dans une voie de différenciation (ici ostéoblastique), les hCSMs perdent leur activité autophagique basale (Figure 9D). Néanmoins, une augmentation du nombre d'autophagosomes est observée lors d'une carence nutritive (HBSS) ou de l'inhibition de la protéine mTOR par la rapamycine (Figure 9D).

L'analyse de la capacité de dégradation des protéines à longue durée de vie montre que l'activité autophagique est plus importante dans les hCSMs non différenciées que dans les cellules différenciées en présence de BDNF, que ce soit au niveau basal (13% contre seulement 9%) ou lors d'une carence nutritive (17% contre 11% ; Figure 10A). La fusion entre les autophagosomes et les lysosomes permet la formation des autophagolysosomes. Cependant, cette étape décisive dans la dégradation des protéines peut être inhibée par la Bafilomycine A1 (Klionsky *et coll.*, 2008). En effet, la Bafilomycine A1 inhibe la protéolyse associée à la carence nutritive dans les hCSMs non différenciées (figure 10A). La protéolyse en présence de cette molécule est plus faible que celle mesurée dans les cellules en conditions normales. Ces résultats confirment la présence d'une activité autophagique basale (Figure 10A). Cependant, la Bafilomycine A1 ne provoque pas de mort cellulaire à moins d'être associée à un traitement étoposide. Dans ce cas, l'association des deux drogues déclenche une mortalité cellulaire plus importante soit 20% de mortalité à 48h contre seulement 10% lors d'un traitement étoposide seul (Figure 10B). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'autophagie participe à la survie cellulaire des hCSMs lors de stimuli apoptotiques.

Afin de vérifier l'importance de l'autophagie dans la survie des hCSMs non différenciées, une approche par ARN interférence dirigé contre la protéine Atg7 est mise en place (figure 10C). En effet, cette protéine joue un rôle central dans l'autophagie et son extinction est décrite comme inhibant ce programme. Lorsque la protéine Atg7 n'est plus exprimée dans les hCSMs, il y a une forte diminution du marquage MDH en conditions normales (figure 10C). Ceci traduit une activité autophagique basale des hCSMs non différenciées en conditions normales (figure 10C). Cependant, l'extinction d'Atg7 ne diminue pas la viabilité cellulaire sauf si les hCSMs sont traitées avec de l'étoposide. Dans ce cas, il y a une diminution de 40% de la viabilité cellulaire, confirmant ainsi l'importance du processus autophagique dans la survie des hCSMs (figure 10D).

6. Importance de Bcl-xL dans la survie des hCSMs

La protéine Bcl-xL, tout comme Bcl-2, est un membre anti-apoptotique qui régule la perméabilisation mitochondriale (voir introduction). Nous avons alors étudié l'importance de l'expression de Bcl-xL dans les hCSMs en utilisant une approche lentivirale d'ARN interférence dirigé contre cette protéine (Figure 11A). L'extinction de Bcl-xL ne module pas la viabilité des hCSMs en conditions normales. Cependant, cette extinction sensibilise les

hCSMs à l'étoposide. En effet, il y a une diminution de 80% de la viabilité cellulaire après 20h de traitement à l'étoposide pour les cellules n'exprimant plus Bcl-xL (Figure 11C). Cependant, Bcl-xL est également décrit comme régulant également l'activité autophagique (Shimizu *et coll.*, 2004).

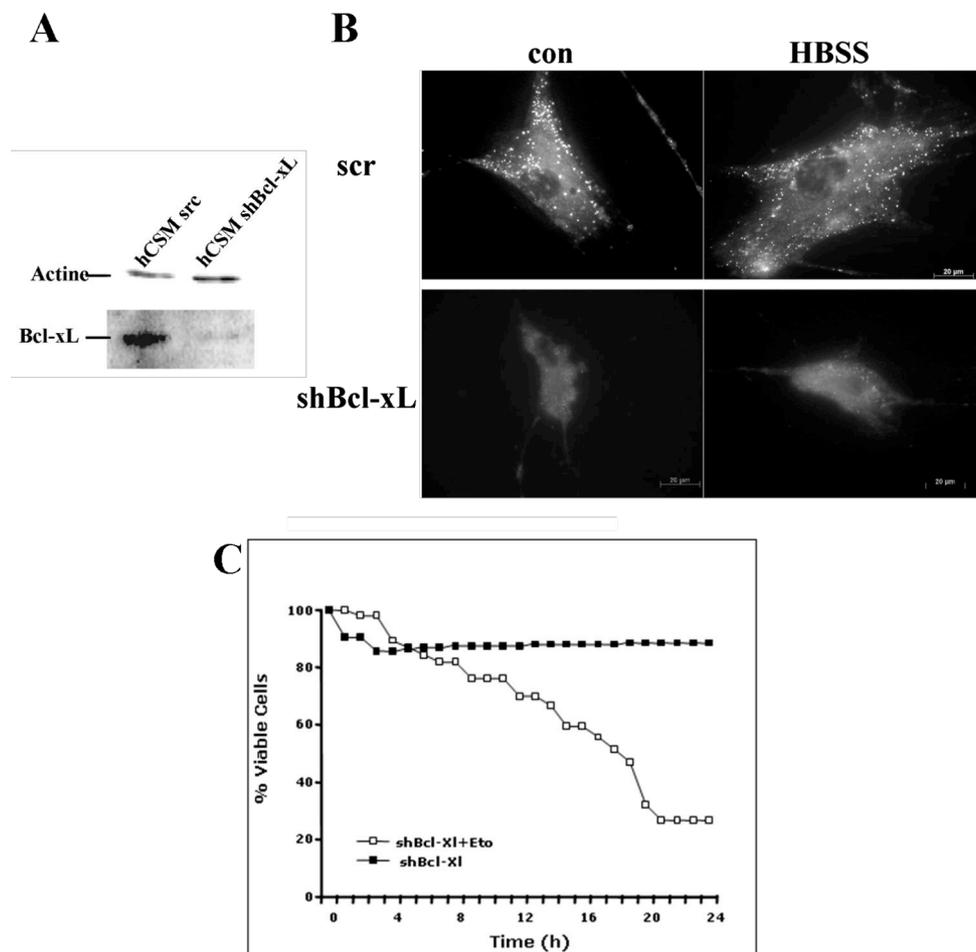


Figure 11 : Capacité autophagique des cellules contrôles et shBcl-xL.

(A) Les hCSMs ont été infectées avec des particules contrôles (scr) ou shBcl-xL. (B) La réponse autophagique des cellules est analysée par un marquage MDH. La capacité autophagique basale des cellules est observée en milieu contrôle (con) et la réponse autophagique lors d'une carence nutritive est observée en HBSS. (C) Les hCSMs sont traitées ou pas avec de l'étoposide.

Les hCSMs possèdent une forte activité autophagique basale ainsi qu'une capacité de réponse lors d'une carence nutritive (Figure 11B, en haut). A l'inverse, lorsque les hCSMs sont déficientes en Bcl-xL, elles perdent leur activité autophagique basale. De plus, lors d'une carence nutritive, ces cellules ne déclenchent qu'une faible réponse autophagique (Figure 11B, en bas). La protéine Bcl-xL est donc importante dans l'activité autophagique basale ainsi que dans l'induction de la réponse autophagique.

Ces résultats confirment l'importance de l'expression de cette protéine anti-apoptotique dans la survie cellulaire des hCSMs non différenciées lors d'un stimulus apoptotique.

7. Régulation épigénétique de Bcl-2 dans les hCSMs

Le terme épigénétique définit les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques. Ce terme qualifie ce qui résulte de modifications de l'ADN ou des protéines liées à l'ADN comme les histones. La régulation de l'expression des gènes par les mécanismes épigénétiques est très finement contrôlée et est essentielle pour le développement de l'organisme (Li, 2002). Les phénomènes épigénétiques constituent un programme qui décide des gènes à activer ou, *a contrario*, à inhiber. L'expression des gènes peut être régulée par l'état de la chromatine. Celle-ci peut être dite "ouverte" permettant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle et l'expression génique (figure 12A) ou "fermée", empêchant l'expression d'un gène (Figures 12B et 12C). L'état de la chromatine est dicté par les modifications post-traductionnelles des protéines liées à l'ADN : les histones. L'acétylation de lysines par les histones acétyltransférases (HAT) entraîne l'ouverture de la chromatine permettant ainsi la transcription (Figure 12A). En effet, l'acétylation augmente la compacité de la chromatine et diminue la force d'interaction entre les histones et l'ADN. A l'inverse, la désacétylation par les histones désacétylases (HDAC) est associée à la répression de la transcription *via* des mécanismes inverses (Figure 12B). La méthylation de ces protéines au niveau de résidus lysines entraîne également une fermeture de la chromatine (Figure 12C). L'ouverture de la chromatine peut être obtenue par inhibition des DNMTs (DNA (cytosine-C5) MethylTransferase) et des HDACs (Figure 12).

La protéine Bcl-2 n'est pas exprimée dans les hCSMs non différenciées (Figure 4A). Cependant, les hCSMs expriment cette protéine qu'après induction de leur différenciation (figure 13). En effet, l'expression de l'ARNm codant pour Bcl-2 augmente 10 fois dès une semaine de différenciation par rapport aux hCSMs non différenciées. L'expression de Bcl-2 est augmentée de plus de 110 fois après 3 semaines de différenciation par rapport aux cellules non différenciées (Figure 13). De plus, nous observons une expression de Bcl-2 au bout de 2 et 3 semaines de traitement en milieu contrôle (Figure 13). Toutefois, il est à noter, d'une part, que les hCSMs ont été cultivées 4 semaines avant le début du traitement afin d'amplifier le

nombre de cellules. D'autre part, il a été montré que les hCSMs sont capables de perdre certaines de leurs propriétés et/ou subissent des altérations géniques après de nombreux doublings de population ou de longue durée de culture. L'expression de Bcl-2 dès 2 semaines de traitement en milieu contrôle pourrait donc être due au fait que les hCSMs ont été gardées trop longtemps en culture. En effet, 3 semaines d'amplification et 2 semaines de traitements, soit 5 semaines de cultures au final, semblent a priori suffisantes pour modifier l'expression de certains gènes et notamment Bcl-2.

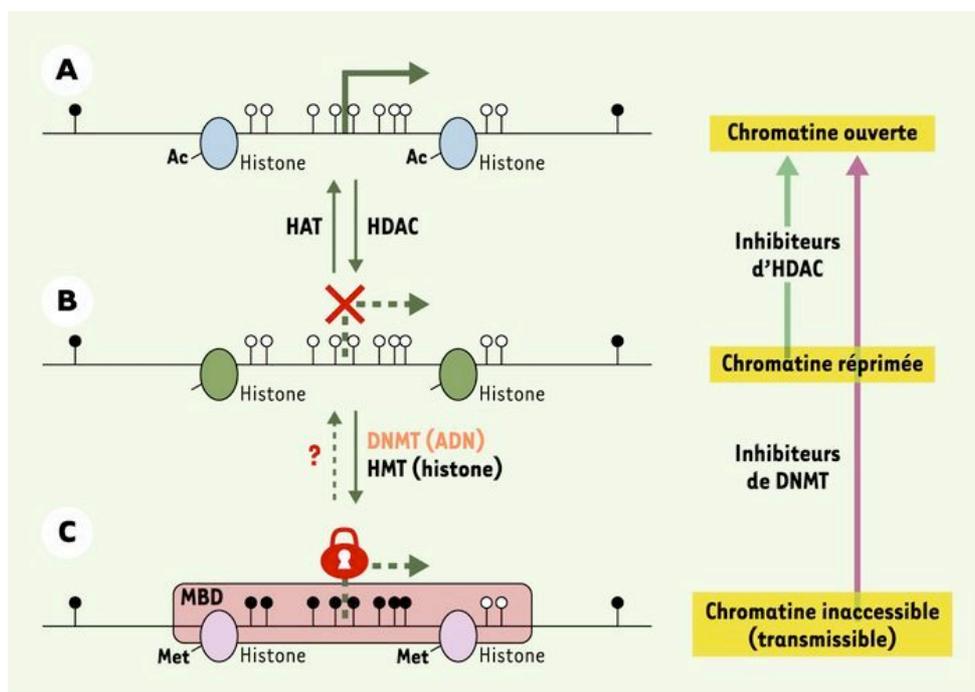


Figure 12 : Représentation schématique des modifications épigénétiques des histones (D'après Deltour *et coll.*, 2005).

Les résultats suggèrent que la répression de la transcription du gène *BCL2*. Nous avons donc cherché à déstabiliser le statut épigénétique des hCSMs en modulant la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones.

La méthylation de maintenance de l'ADN est catalysée par la DNMT1. Cette enzyme se fixe sur l'ADN hémiméthylé permettant ainsi la méthylation du brin néosynthétisé (Vertino *et coll.*, 1996). La DNMT1 permet alors la conservation du profil de méthylation et de la répression de la transcription (Reik *et coll.*, 2001).

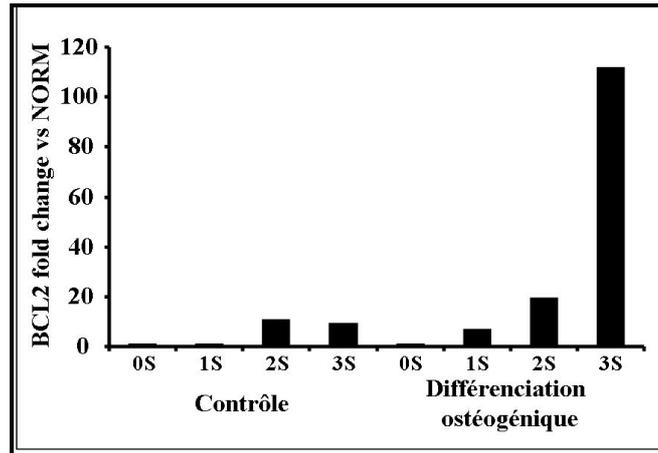


Figure 13 : Expression de Bcl-2 au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs.

Les hCSMs sont cultivées en milieu contrôle ou en milieu de différenciation pendant 1, 2 ou 3 semaines. Les ARN totaux sont extraits puis l'expression de l'ARNm codant pour Bcl-2 est analysée par TLDA.

Afin de déstabiliser le statut de méthylation, nous utilisons un inhibiteur de la DNMT1, le 5-aza-2-deoxycytidine ou 5-AzaC (Christman, 2002). Cette molécule provoque alors la transcription du gène en déméthylant l'ADN. Les hCSMs sont traitées avec du 5-AzaC à 500 nM pendant 12, 18 et 24 h. Les cellules du myélome KMS11 servent de contrôle pour visualiser l'expression de Bcl-2. Cependant, la déméthylation seule ne permet pas l'expression protéique de Bcl-2 dans nos cellules (Figure 14A). Nous avons donc modulé l'acétylation des histones. Pour cela, nous avons traité les hCSMs avec un inhibiteur des HDACs, la trichostatine A (TSA). La TSA est utilisée à une concentration de 150 nM et provoque une acétylation des histones. Lorsque la déméthylation est combinée avec l'hyperacétylation de l'histone, il y a expression de Bcl-2 (Figure 14B). En effet, lorsque les hCSMs sont traitées avec 500 nM de 5-AzaC et 150 nM de TSA, il y a expression de Bcl-2 dès 12h de traitement avec un pic à 18h (Figure 14B). Cependant, après 24h de traitement, il n'y a plus d'expression de Bcl-2 (Figure 14B). Le gène de BCL2 est donc réprimé par méthylation de l'ADN mais également une désacétylation des histones.

Il reste à comprendre pourquoi la transcription de Bcl-2 est réprimée dans les hCSMs non différenciées. En effet, si nous mettons en parallèle la sensibilité à l'apoptose des hCSMs et l'expression de Bcl-2 au cours de la différenciation, nous pouvons supposer que la présence de cette protéine sensibilise les hCSMs aux inducteurs d'apoptose. Or, Bcl-2 est un membre anti-apoptotique, donc son expression devrait permettre la survie des hCSMs et non la sensibilisation de ces cellules à la mort cellulaire. Néanmoins, Bcl-2 a été décrit comme

inhibant la réponse autophagique dans certains types cellulaires lors de stimuli apoptotiques (Pattingre *et coll.*, 2005). De plus, si nous mettons en parallèle l'activité autophagique des hCSMs et l'expression de Bcl-2 au cours de la différenciation, nous pouvons supposer que la présence de cette protéine inhibe l'autophagie basale dans les hCSMs. En effet, la sensibilité à l'apoptose et l'expression de Bcl-2 augmentent au cours de la différenciation alors que l'activité autophagique basale diminue. Dans ce cas, l'expression de Bcl-2 diminuerait alors la résistance des hCSMs aux inducteurs d'apoptose par inhibition de l'activité autophagique basale.

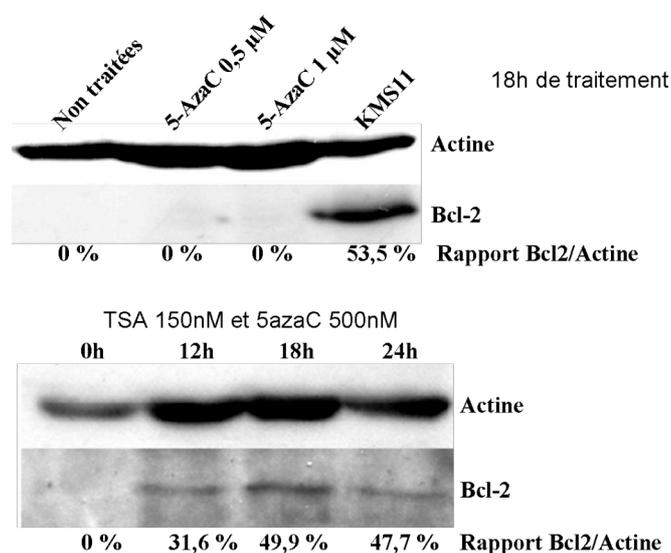


Figure 14 : Expression de Bcl-2 après modification du statut génétique des hCSMs.

Les hCSMs sont traitées pendant 18h avec 0 μM, 0, 5μM ou 1 μM de 5-AzaC. Les cellules KMS11 expriment Bcl-2 et servent de contrôle (A). Les hCSMs sont traitées avec 150 nM de TSA et 500 nM de 5-AzaC pendant 0h, 12h, 18h ou 24h (B). L'expression de Bcl-2 est analysée par immunoprinte à partir des extraits protéiques totaux de ces cellules.

Dans un futur très proche, nous exprimerons Bcl-2 par inhibition des HDACs et de la DNMT1. Nous étudierons alors l'activité autophagique basale de cellules. En parallèle, nous induirons l'apoptose dans ces cellules afin de voir si l'expression de Bcl-2 sensibilise les hCSMs à la mort cellulaire.

CHAPITRE II : ROLE DE LA CASPASE-3 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION

AVANT-PROPOS

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous intéressons au rôle de la Caspase-3 au cours de la différenciation cellulaire ainsi qu'aux substrats possibles de cette protéine. La Caspase-3 est l'une des protéases à cystéine majeure activée au cours de l'apoptose et elle en est un facteur clé. Néanmoins, elle a été récemment décrite comme participant au processus de différenciation des cellules sanguines (Zermati *et coll.*, 2001), des kératinocytes (Weil *et coll.*, 1999), des macrophages (Sordet *et coll.*, 2002), des fibres du cristallin (Ishizaki *et coll.*, 1998) et des cellules du muscle squelettique (Fernando *et coll.*, 2002). L'énucléation observée au cours de la différenciation des kératinocytes et des fibres du cristallin apparaît comme similaire à un processus apoptotique incomplet (Ishizaki *et coll.*, 1998 ; Weil *et coll.*, 1999). Dans le cas de la formation des érythrocytes, les inhibiteurs de Caspase supprime l'extrusion nucléaire et la formation des érythrocytes (De Maria *et coll.*, 1999 ; Zermati *et coll.*, 2001). L'activation des caspases est également associée à la thrombopoïèse, soit la fragmentation des proplaquettes provenant des mégacaryocytes (De Botton *et coll.*, 2002), à la différenciation des macrophages (Sordet *et coll.*, 2002) et du muscle squelettique (Fernando *et coll.*, 2002). L'augmentation de la Caspase-3 est également observée au cours de la différenciation des neurones proencéphaliques (Yan *et coll.*, 2001). Pour chacun de ces processus, l'expression de la Caspase-3 est transitoire et seulement une partie de la machinerie de l'apoptose est utilisée pendant la différenciation. En 2008, les travaux des équipes de Fujita et Janzen suggèrent que la Caspase-3 agit à différents moments de la vie des cellules souches hématopoïétiques (hCSH), affectant l'autorenouvellement et la différenciation de ces cellules (Fujita *et coll.*, 2008 ; Janzen *et coll.*, 2008). En effet l'équipe de Fujita montre que la Caspase-3 limite la pluripotence des hCSHs par le clivage direct d'une seule protéine, Nanog. Ainsi, la Caspase-3 semble participer à la différenciation des cellules souches en limitant l'autorenouvellement de ces dernières (Fujita *et coll.*, 2008). De plus, l'équipe de Janzen montre que la perte de la Caspase-3 provoque une réduction dramatique de la maturation des lymphocytes B, étape nécessitant l'arrêt de l'autorenouvellement (Janzen *et coll.*, 2008).

Il a été précédemment montré que la Caspase-3 était nécessaire à la différenciation ostéogénique *in vitro* de la lignée cellulaire ostéoblastique MC3T3-E1 (Mogi et Togari, 2003). L'équipe de Shi a également montré que la Caspase-3 jouait un rôle critique *in vivo*

dans les processus de développement et de remodelage osseux (Miura et coll., 2004). En effet, des souris déficientes en Caspase-3 présentent des défauts osseux dès les étapes précoces du développement (Miura et coll., 2004). De plus, les cellules BMSSCs provenant de ces souris ont une capacité de prolifération et un potentiel de différenciation ostéogénique diminués (Miura et coll., 2004).

Notre objectif est de comprendre l'implication de la Caspase-3 dans la différenciation ostéogénique. Pour cela, nous utiliserons une approche d'ARN interférence dirigée contre la Caspase-3 dans les hCSMs. Ensuite, nous essayerons de mettre en évidence les substrats de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses par une approche protéomique.

ARTICLE : PUTATIVE ROLE OF CASPASE-3 DURING MESENCHYMAL STEM CELLS DIFFERENTIATION (EN REDACTION)

Classiquement, la Caspase-3 est clivée au cours de l'apoptose par les caspases initiatrices -8 et -9 en fragments de 19 puis 17 et 12 kDa (Figure 15). Cependant, au cours de la différenciation ostéogéniques, nous avons observé que la procaspase-3 était clivée en fragments de 29 puis de 25 kDa dès 4 jours de différenciation (Figure 16). Ce clivage atypique a déjà été décrit au sein du laboratoire par Maud Pelletier et ses collaborateurs comme étant un clivage de la Caspase-3 par la Calpaïne en présence de calcium (Figure 15) (Pelletier et coll., 2005).

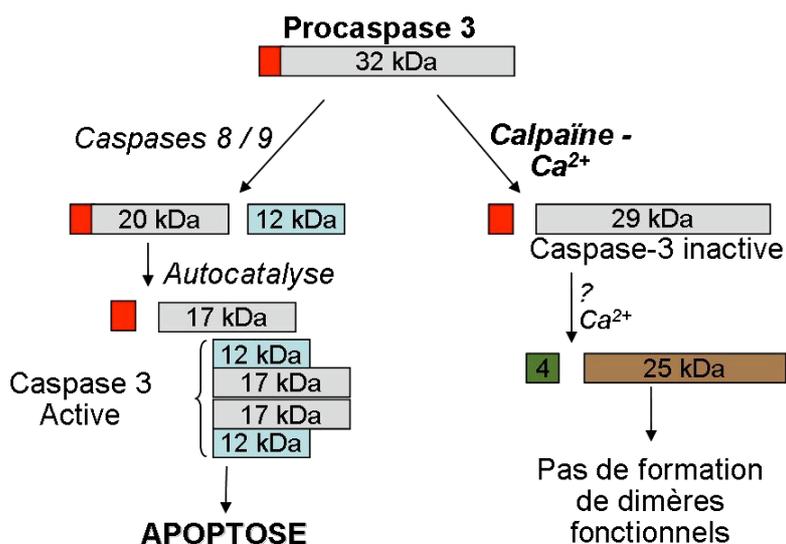


Figure 15 : Clivage de la Caspase-3 par les caspases initiatrices et par la calpaïne.

Nous avons donc vérifié que la Caspase-3 était clivée par la calpaïne au cours de la différenciation ostéogénique. Pour cela, les hCSMs sont différenciées en présence d'un inhibiteur de cette protéase, l'ALLN (Calbiochem, réf. 208719). Cet inhibiteur semble empêcher le clivage de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique (Figure 16). La calpaïne est donc impliquée dans les étapes précoces de la différenciation ostéogénique.

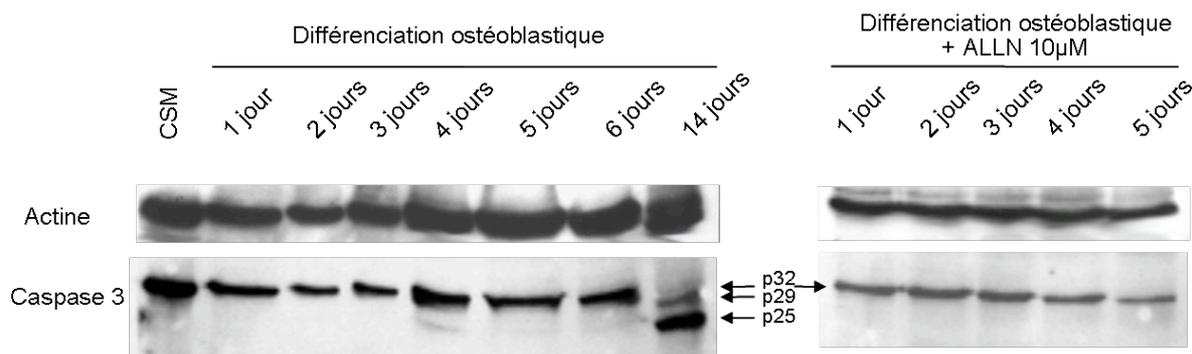


Figure 16 : La Caspase-3 est clivée au cours de la différenciation ostéogénique et ce clivage est inhibé en présence de l'inhibiteur de la calpaïne ALLN.

Les hCSMs sont alors cultivées en milieu de différenciation pendant 14 jours en présence ou pas de 10 μ M d'inhibiteur de la calpaïne, l'ALLN. L'expression de la Caspase-3 est alors visualisée par immunoempreinte sur extraits protéiques totaux.

1. Implication de la calpaïne dans la différenciation ostéogénique

Les calpaïnes sont des enzymes cytoplasmiques, non lysosomales, neutres et dépendantes du calcium pour leur activation (Croall et McGrody, 1994). Bien qu'elles soient impliquées dans une grande variété de processus cellulaires liés au calcium, les calpaïnes ont pour unique fonction la protéolyse limitée et irréversible de substrats cibles.

Tout comme les caspases, les calpaïnes sont synthétisées sous forme d'apoenzymes. En conditions physiologiques normales, les taux calciques sont trop faibles au sein des cellules pour que les calpaïnes soient actives. Leur activation est dépendante de la concentration en calcium présente dans le milieu. Les calpaïnes ont été décrites comme pouvant réguler la différenciation ostéogénique de la lignée MC3T3-E1. En effet, leur activité augmente au cours de la différenciation (Murray et coll., 1997a). De plus, l'inhibition de la calpaïne par la molécule E64d, par alkylation du site actif à cystéine de ces protéases, diminue l'activité de la phosphatase alcaline (Murray et coll., 1997b).

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle de la calpaïne dans la différenciation ostéogénique des hCSMs. Pour cela, l'activation de la calpaïne au cours de la différenciation

ostéogénique est analysée par immunoempreinte. Le clivage de la sous-unité de 30 kDa en 18 kDa est présent dès 2 jours de différenciation (Figure 17A). La calpaïne semble être activée précocement au cours de la différenciation. Ces résultats sont confirmés par un marquage *in vivo* des hCSMs avec un substrat fluorogénique de la calpaïne, le [CMAC, t-BOC-Leu-Met]. Lorsque la calpaïne est activée, ce substrat est clivé et il émet alors dans les UV. Après 2 jours de différenciation ostéogénique, les cellules deviennent positives à ce marquage (Figure 17B). L'activité de la calpaïne est mesurée en fluorophotométrie avec le substrat fluorogénique SLLVL-AMC. Une augmentation de l'activité de la calpaïne est également observée après 2 jours de différenciation, cette activité est constante au cours des 6 premiers jours. Cette activité est similaire à celle obtenue lorsque les hCSMs sont traitées avec de la thapsigargin (Figure 17C). La thapsigargin est un inhibiteur des protéines constituant les pompes calciques localisées au niveau du réticulum sarcoplasmique et du réticulum endoplasmique. La thapsigargin augmente donc la concentration calcique intracellulaire et active ainsi les calpaïnes. Le traitement des hCSMs par la thapsigargin sert donc de contrôle positif à l'activation des calpaïnes au cours de la différenciation ostéogénique.

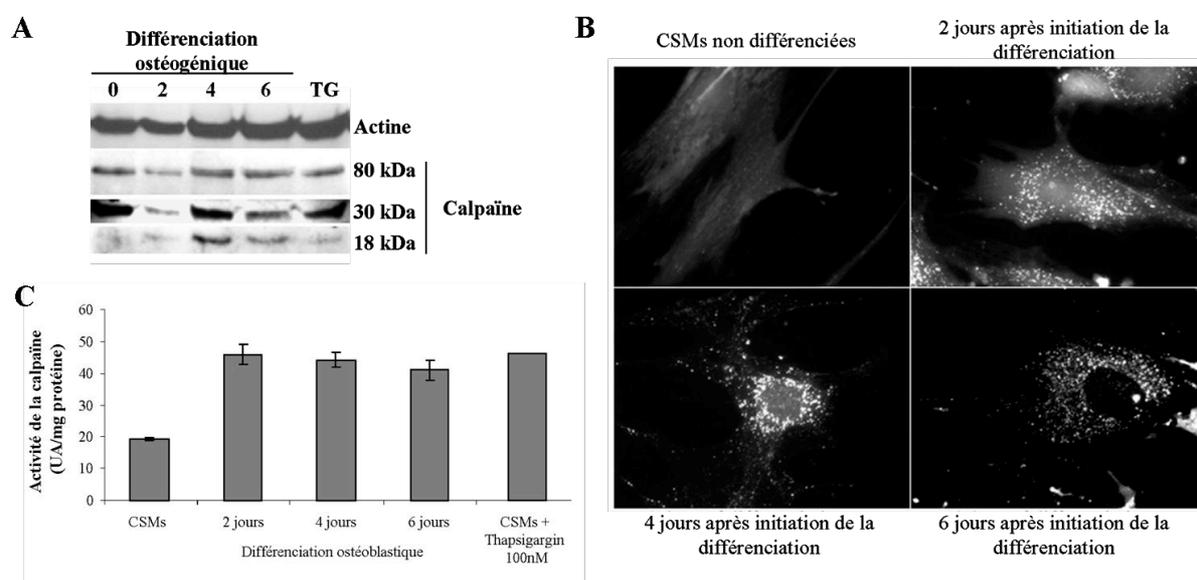


Figure 17 : Implication de la calpaïne au cours de la différenciation ostéogénique.

(A) Le clivage de la calpaïne au cours de la différenciation ostéogénique est observée par immunoempreinte. (B) L'activation de la calpaïne est visualisée par un marquage *in vivo* avec le substrat fluorogénique de cette protéase (CMAC, t-BOC-Leu-Met). (C) L'analyse du clivage du substrat fluorogénique SLLVL-AMC permet de mesurer l'activité de la calpaïne par fluorophotométrie.

La calpaïne semble importante à la différenciation ostéogénique des hCSMs. Afin de confirmer cette hypothèse, les hCSMs sont différenciées en présence ou pas d'ALLN, inhibiteur de la calpaïne. La capacité de différenciation des cellules avec les différents traitements est analysée par l'intermédiaire des marqueurs de la différenciation ostéogénique, l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) et la minéralisation. En effet, l'activité de la PAL augmente au cours de la différenciation et la formation des nodules minéraux est un marqueur tardif de différenciation ostéogénique. Cette minéralisation est visualisée par une coloration rouge alizarine.

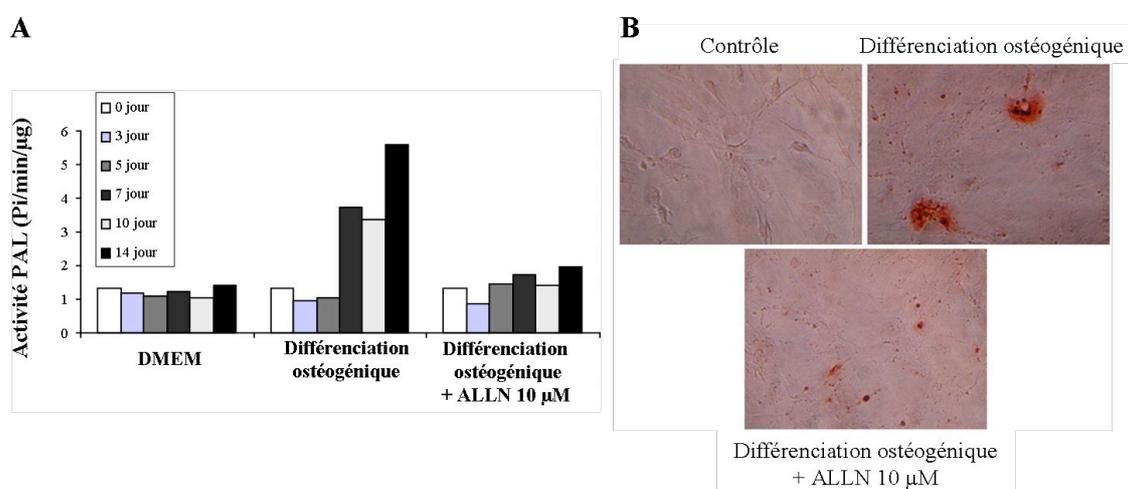


Figure 18 : L'inhibition de la calpaïne retarde la différenciation ostéogénique.

La capacité de différenciation ostéogénique est déterminée par la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL ; **A**) et par la visualisation des nodules minéraux par coloration rouge alizarine (**B**).

Au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs, l'activité de la phosphatase alcaline est croissante dès 5 jours de traitement. A l'inverse, lorsque les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de la calpaïne, il n'y a plus d'augmentation de la phosphatase alcaline au cours de la différenciation (Figure 18A). Ces résultats sont confirmés par la coloration rouge alizarine avec la formation de nodules minéraux en présence de milieu de différenciation, formation inhibée en présence d'ALLN (Figure 18B). L'inhibition de la calpaïne retarde donc la différenciation ostéogénique des hCSMs et souligne ainsi l'importance de la calpaïne dans ce processus de différenciation.

2. Importance de la Caspase-3 dans la différenciation ostéogénique

Du fait de l'importance de la calpaïne dans la différenciation ostéogénique, nous nous sommes intéressés dans un second temps à son substrat, la Caspase-3. Comme le montre la figure 16, la Caspase-3 est clivée en fragment de 29 et 25 kDa au cours de la différenciation et ce clivage est aboli en présence d'inhibiteur de calpaïne.

Une analyse par électrophorèse bidimensionnelle, le BN-PAGE (Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) semble mettre en évidence un complexe entre la calpaïne et la Caspase-3 au cours de la différenciation. La première dimension est réalisée en conditions non dénaturantes et permet la séparation des complexes protéiques en fonction de leur poids moléculaire. La seconde électrophorèse est réalisée après dénaturation des pistes de la première dimension. Cette seconde dimension sépare alors les différents éléments constituant les complexes protéiques.

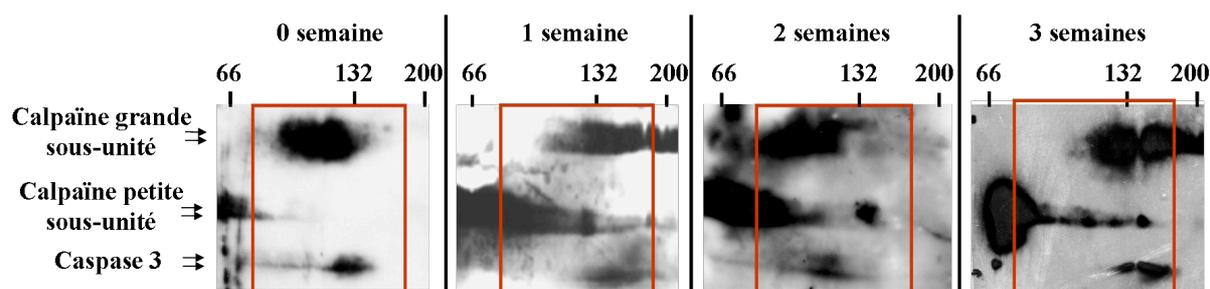


Figure 19 : Analyse en BN-PAGE des complexes calpaïne-Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique.

Les hCSMs sont cultivées en milieu complet pendant une semaine puis en milieu de différenciation pendant 0, 1, 2 et 3 semaines. Les extraits protéiques sont fractionnés et la fraction cytosolique est analysée par BN-PAGE. Les présences de la Calpaïne et de la Caspase-3 sont visualisées par immunoempreinte.

La sous-unité de la calpaïne semble être présente sous forme dimérique. En effet, cette sous-unité de 30 kDa non activée est présente à 60 kDa. La grande sous-unité de la calpaïne et la Caspase-3 sortent à leur poids moléculaire respectif de 80 et 32 kDa (Figure 19).

En conditions normales (0 semaine), il semblerait que la procaspase-3 soit complexée à la grande sous-unité de la calpaïne car il y a présence de ces 2 protéines pour un complexe d'environ 120 kDa, soit 80 kDa et 32 kDa. Quand à la petite sous-unité de la calpaïne, elle ne semble pas être associée à une autre protéine car elle appartient à un complexe d'environ 60 kDa soit celui d'un dimère (Figure 19).

A l'inverse, dès une semaine de différenciation, les sous-unités de la calpaïne semblent se complexer à d'autres protéines car elles sont présentes dans des complexes de 60 à 180 kDa pour la petite et des complexes pouvant atteindre 200 kDa pour la grande sous-unité. De même, la Caspase-3 semble présente dans des complexes plus grands allant jusqu'à 200 kDa. Le BN-PAGE confirme également le clivage de la Caspase-3 en 29 et 25 kDa au cours de la différenciation (Figure 19).

Le complexe de 180 kDa, présent dès une semaine de différenciation, semble correspondre à l'association de la petite (60 kDa) et de la grande sous-unité (80 kDa) avec la Caspase-3 (30 kDa). Ce complexe de 180 kDa présent au cours de la différenciation ostéogénique suggère l'association de la calpaïne et de la caspase-3 au cours de ce processus physiologique. Cependant, le BN-PAGE ne permet pas d'affirmer la présence d'un complexe protéique, il le suggère. Pour confirmer la présence de ce complexe, il aurait fallu réaliser des expériences de pull-down ou de pontages protéiques. Or, ce n'était pas notre objectif premier. Nous nous sommes concentrés sur le rôle de la Caspase-3 au cours de la différenciation. Pour cela, nous avons utilisé une approche de particules lentivirales exprimant des shRNA contrôles ou des shRNA dirigés contre la Caspase-3. Les hCSMs sont infectées avec une MOI de 15.

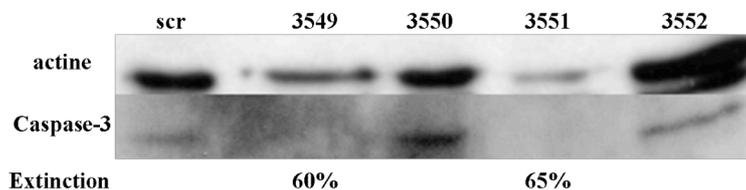


Figure 20 : Extinction de la Caspase 3 par une approche shRNA

Les hCSMs sont infectées par des particules virales contrôles (scr) ou shCaspase-3 3549, 3550, 3551 et 3552 avec une MOI de 15. L'extinction de la Caspase-3 est vérifiée sur des extraits protéiques totaux par immunoempreinte. Le rapport Caspase-3/ actine est calculé pour chaque échantillon puis il est rapporté à celui des cellules contrôles (scr).

Avant d'initier la différenciation ostéogénique des hCSMs après leur infection, l'extinction de la Caspase-3 est vérifiée par immunoempreinte (Figure 20) et par TLDA. Les particules shCaspase-3 3549 et 3551 diminuent de 60% l'expression de la Caspase-3 dans les hCSMs par rapport aux cellules contrôles (Figure 21). Ce sont donc ces particules qui seront utilisées dans la suite de nos expériences. L'expression de l'ARN codant pour la Caspase-3 augmente légèrement dans les étapes terminales de la différenciation des hCSMs, suggérant que la Caspase-3 est importante pour les hCSMs. Une augmentation de l'ARNm codant pour la

Caspase-3 est également observée dans les hCSMs shCaspase-3 au cours de la différenciation. Cependant, l'expression de la Caspase-3 dans les cellules contrôles est plus importante que dans les cellules infectées avec les shCaspase-3 (Figure 21).

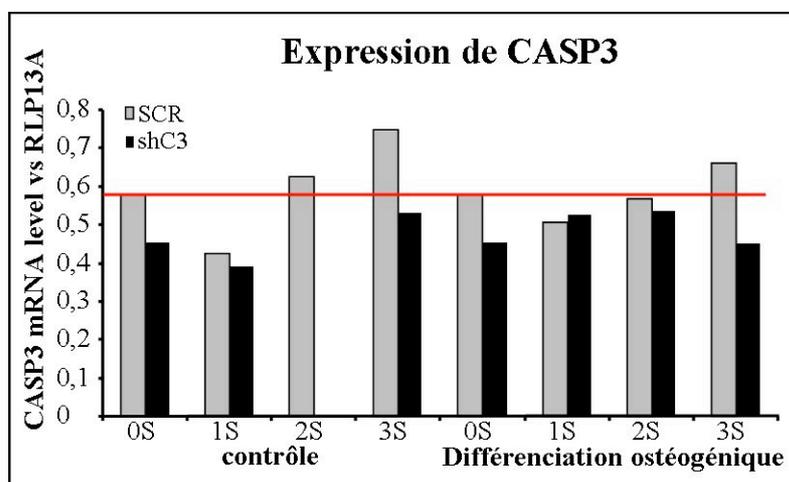


Figure 21 : Analyse TLDA de l'expression de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique.

Les hCSMs sont infectées par des particules virales contrôles (scr) ou shCaspase-3 avec une MOI de 15. Les cellules sont alors cultivées en milieu contrôle ou en milieu de différenciation pendant 1, 2 ou 3 semaines. Les ARN totaux de ces cellules sont extraits puis analysés par TLDA.

La capacité de différenciation ostéogénique des cellules infectées est déterminée par l'activité de la phosphatase alcaline. Les hCSMs infectées par les particules contrôles présentent une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline tout au long de la différenciation ostéogénique allant jusqu'à une activité de 30 Pi/min/ μ g de protéine. Les cellules infectées avec les shRNA dirigés contre la Caspase-3 présentent également une augmentation de l'activité phosphatase alcaline. Cependant, leur activité est plus faible, n'atteignant que 15 Pi/min/ μ g de protéines. L'extinction de la Caspase-3 semble donc retarder la différenciation ostéogénique des hCSMs (Figure 22).

Ces résultats sont confirmés par la minéralisation formée lors des étapes terminales de la différenciation ostéogénique. En effet, les cellules contrôles forment des nodules minéraux à 3 semaines de différenciation (Figure 23, en haut). Ces nodules sont observables soit par coloration rouge alizarine soit en contraste de phase. A l'inverse, les cellules n'exprimant plus la Caspase-3 perdent la capacité de former des nodules minéraux (Figure 23, en bas). Donc, l'extinction de cette protéine retarde la différenciation ostéogénique.

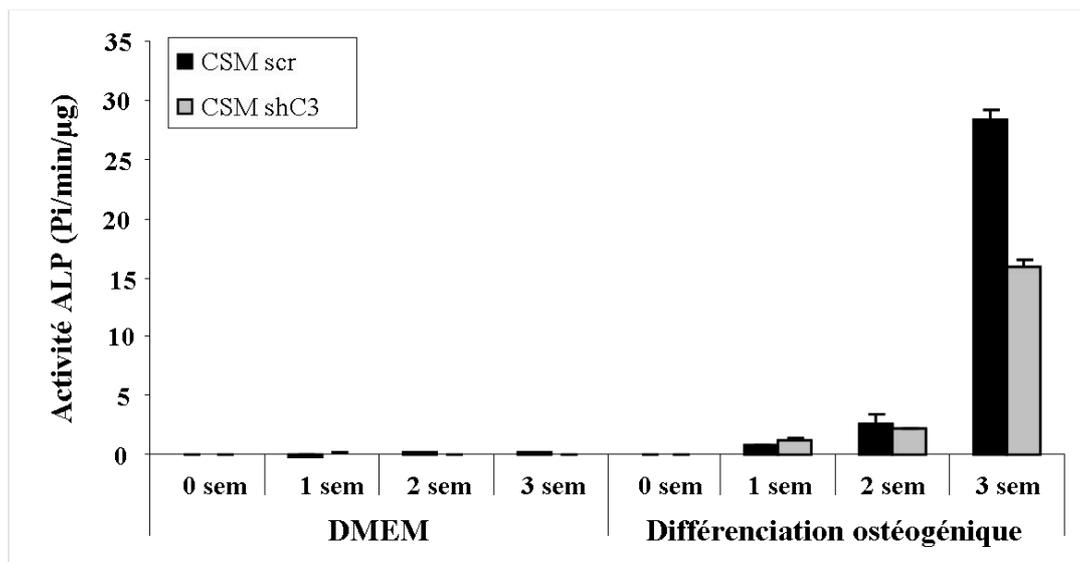


Figure 22 : Implication de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs.

Les hCSMs sont infectées par des particules virales contrôles (scr) ou shCaspase-3 avec une MOI de 15. Les cellules sont alors cultivées en milieu contrôle ou en milieu de différenciation pendant 1, 2 ou 3 semaines. Les protéines totales sont alors extraites et l'activité de la phosphatase alcaline est mesurée pendant 10 min à 37°C.

Cependant, l'expression de plusieurs ARN messagers, codant pour des facteurs impliqués dans la différenciation ostéogénique comme la PAL et le MGP (Matrix Gla Protein), augmente au cours de ce processus pour les deux types cellulaires. De façon surprenante, les cellules shCaspase-3 expriment plus fortement la phosphatase alcaline avec une variation (Fold-change) de 180 contre 120 pour les cellules contrôles (Figure 24A). Il en est de même pour l'expression de MGP, avec une variation (Fold-change) de 150 contre 40 pour les cellules contrôles (Figure 24B). Malgré l'expression de la phosphatase alcaline et de la MGP, les hCSMs shCaspase-3 semblent incapables de former des nodules minéraux (Figure 23).

Nous nous sommes donc intéressés à l'expression des protéines de morphogénèse osseuse que sont les protéines BMP-2 et BMP-4 (Bone Morphogenic Protein 2/4). Ces protéines participent à la minéralisation de la matrice osseuse (Suzuki et coll., 2006). Il y a une forte augmentation de l'expression de la BMP-2 au cours de la différenciation des hCSMs contrôles avec une variation (Fold-change) de 14 par rapport à 4 pour les shCaspase-3 (Figure 24C). L'expression de la BMP-4 augmente également au cours de la différenciation ostéogénique dans les hCSMs contrôles. Cependant, l'expression de la BMP-4 augmente très fortement à 1 semaine de différenciation puis son expression diminue dans le temps pour les cellules shCaspase-3 (Figure 24D).

De façon surprenante, nous observons une variation de l'expression des ARN codant pour les BMP2 et BMP4 dans les cellules cultivées en milieu contrôle. Ces protéines ont été initialement découvertes dans l'os, d'où le nom de Bone Morphogenetic Proteins. Ces morphogènes, membres de la superfamille du TGF- β , participent à la chondrogenèse et l'ostéogenèse. Cependant, les BMP interviennent plus généralement dans l'embryogenèse et l'organogenèse. Par ailleurs, la protéine BMP2 a également été décrite comme inhibant le cycle cellulaire des cellules musculaire lisses (Wong *et coll.*, 2003) et de cellules cancéreuses de l'estomac (Wen *et coll.*, 2004). Leur expression au cours d'une longue durée de culture sans amplification peut traduire soit un arrêt du cycle cellulaire, soit une modification morphologique des cellules, sans pour autant induire de différenciation cellulaire même si la présence des BMP dans les cellules conduit à l'expression du facteur de transcription Runx2. En effet, l'expression de l'ALP et de la MGP ne varie pas dans les cellules cultivées en milieu contrôle.

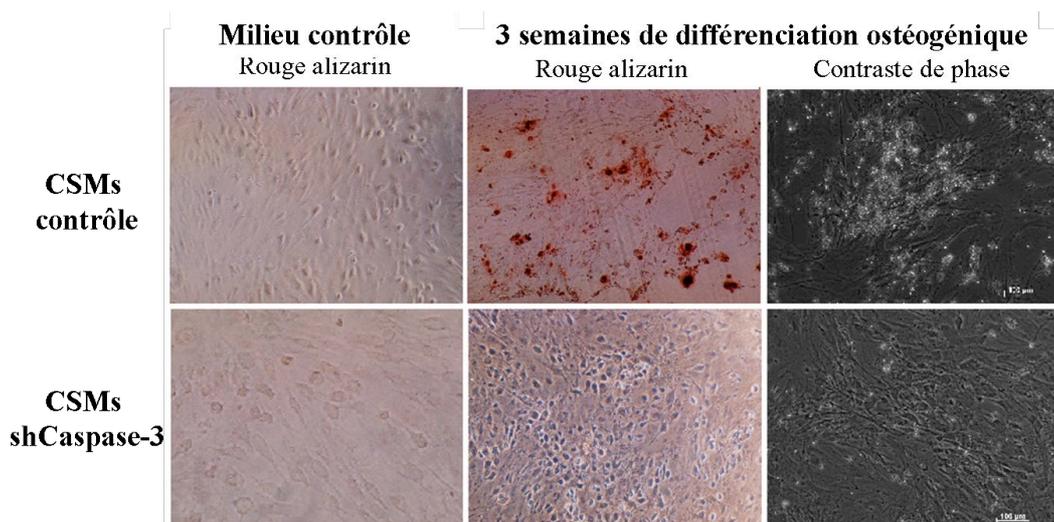


Figure 23 : L'extinction de la Caspase-3 retarde la différenciation ostéogénique des hCSMs.

Les hCSMs sont infectées par des particules virales contrôles (scr) ou shCaspase-3 avec une MOI de 15. Les cellules sont alors cultivées en milieu contrôle ou en milieu de différenciation pendant 3 semaines. La minéralisation est analysée par coloration rouge alizarine ou en contraste de phase.

Les facteurs de transcription Runx2 et Runx3 régulent la différenciation ostéogénique. En effet, ils permettent la transcription de gènes impliqués dans la différenciation comme la PAL, l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Runx2 est impliqué dans les étapes précoces de la différenciation ostéogénique, alors que Runx3 intervient plus tardivement. L'expression du facteur de transcription Runx2 augmente fortement à 1 semaine de différenciation puis son

expression diminue dans le temps de façon similaire pour les deux types cellulaires (Figure 24E). A l'inverse, l'expression du facteur de transcription Runx3 augmente au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs contrôles et shCaspase-3 (Figure 24F).

L'absence de minéralisation serait due à la faible expression de la protéine BMP-2 au sein des cellules shCaspase-3 lors de la différenciation ostéogénique. De plus, les cellules shCaspase-3 expriment fortement la phosphatase alcaline. Cependant, l'activité de cette enzyme est plus faible dans les cellules shCaspase-3 que dans les contrôles. La phosphatase alcaline semble moins fonctionnelle dans les hCSMs shCaspase-3 que les hCSMs contrôles.

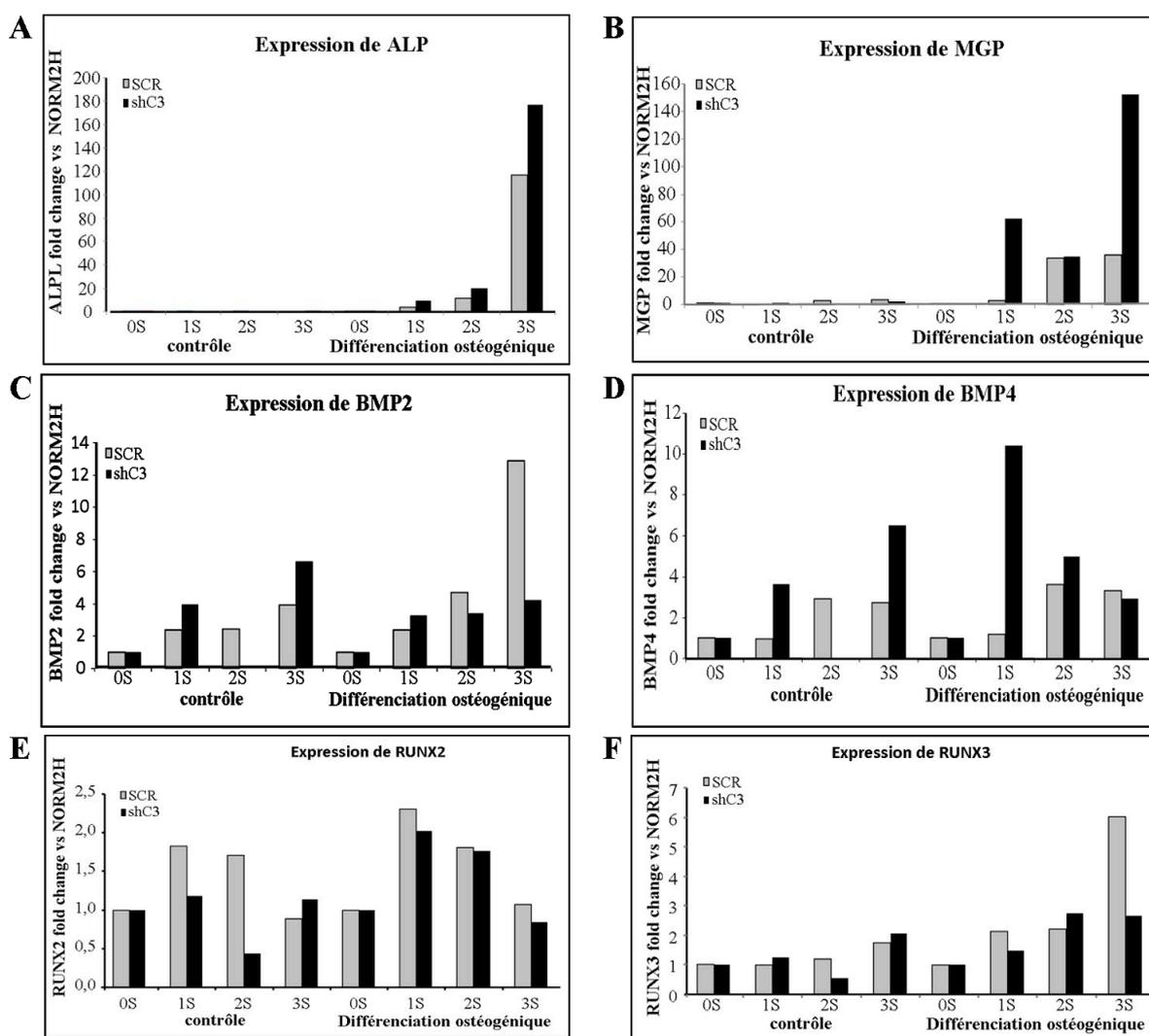


Figure 24 : Analyse TLDA de facteurs de la différenciation ostéogénique.

Les hCSMs sont infectées par des particules virales contrôles (scr) ou shCaspase-3 avec une MOI de 15. Les cellules sont alors cultivées en milieu contrôle ou en milieu de différenciation pendant 1, 2 ou 3 semaines. Les ARN totaux de ces cellules sont extraits puis analysés par TLDA.

Afin de vérifier ces hypothèses, les hCSMs contrôles et shCaspase-3 sont différenciées en présence de BMP-2 et de phosphate inorganique (Pi). En effet, la phosphatase alcaline catalyse la réduction du β -glycérophosphate en phosphate inorganique, permettant alors la formation des nodules minéraux. L'utilisation de Pi compensera alors une déficience de la phosphatase alcaline.

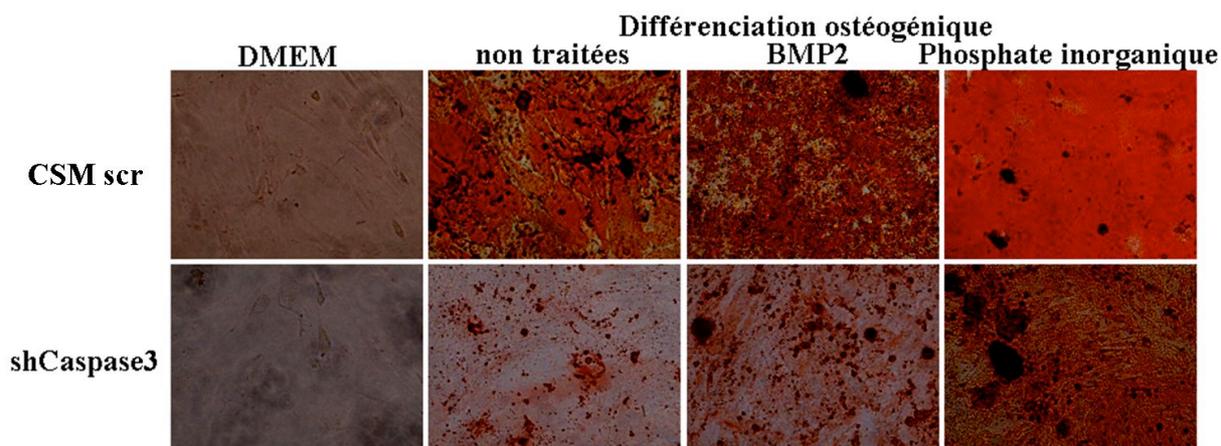


Figure 25 : Analyse de la différenciation ostéogénique des hCSMs en présence de BMP-2 et de phosphate inorganique.

Les hCSMs sont infectées avec des particules lentivirales contrôles et shCaspase-3. Elles sont ensuite cultivées en milieu contrôle (DMEM), en milieu de différenciation ostéogénique seul (non traitées), supplémenté de BMP-2 100 ng/mL (BMP-2) ou supplémenté de Pi 4 μ M (Phosphate inorganique).

Les hCSMs contrôles forment des nodules minéraux après 3 semaines de différenciation ostéogénique (Figure 25, haut). La minéralisation de ces cellules est fortement augmentée en présence de BMP-2 et de phosphate inorganique. A l'inverse, les hCSMs infectées avec les shCaspase-3 ne forment que peu de nodules minéraux (Figure 25, bas). La présence de BMP-2 et de phosphate inorganique dans le milieu de différenciation ostéogénique accentuent la minéralisation de cellules shCaspase-3. Néanmoins, la minéralisation observée dans les cellules shCaspase-3 différenciées en présence de BMP-2 et de Pi est toutefois plus faible que celle obtenue pour les hCSMs contrôles dans les mêmes conditions (Figure 25). L'extinction de la Caspase-3 retarde donc la différenciation ostéogénique dans les hCSMs. De plus, la phosphatase alcaline est moins fonctionnelle dans les cellules shCaspase-3 car la minéralisation obtenue en présence de Pi est similaire à la minéralisation obtenue dans les hCSMs contrôles en milieu de différenciation simple. La présence de BMP-2 est également nécessaire à la minéralisation des cellules shCaspase-3 mais pas suffisante. Il faudrait

supplémenter le milieu de différenciation des cellules shCaspase-3 de BMP-2 mais également de phosphate inorganique pour obtenir une minéralisation de ces cellules.

L'ensemble des résultats obtenus précédemment montrent que la Caspase-3 est importante, mais non essentielle à la différenciation ostéogénique. En effet, l'extinction de cette protéine retarde la différenciation ostéogénique mais ne l'abolit pas complètement. Il semblerait qu'une voie alternative à la Caspase-3 puisse être mise en place au cours de la différenciation afin de compenser l'extinction de la Caspase-3.

Afin de voir si l'implication de la Caspase-3 dans la différenciation cellulaire, est spécifique à l'ostéogenèse, nous avons également étudié la différenciation chondrogénique. Pour cela, les cellules sont infectées avec les particules virales puis cultivées en micromasses pendant 4 semaines, sous hypoxie à 5% d'O₂. En effet, l'hypoxie favorise la différenciation chondrogénique en présence de dexaméthasone et de TGF-β1 (Huang et coll., 2005).

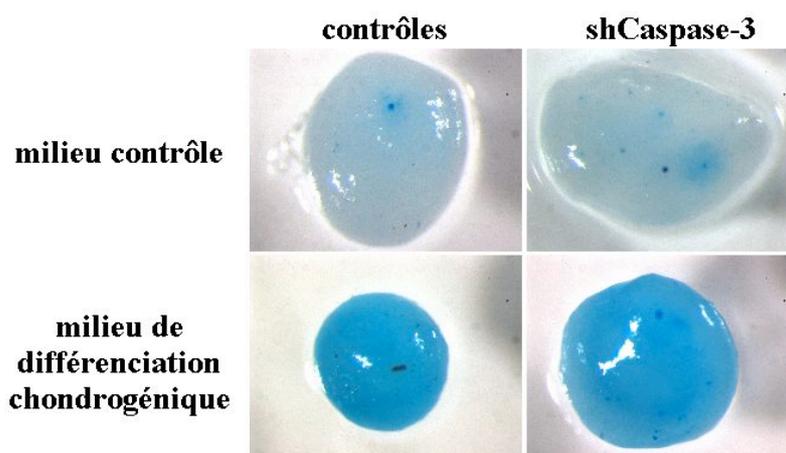


Figure 26 : Implication de la Caspase-3 dans la différenciation ostéogénique.

Les cellules sont infectées avec des particules virales contrôles ou shCaspase-3 puis cultivées en micromasses sous hypoxie en milieu contrôle (en haut) ou en milieu de différenciation ostéogénique (en bas). Les micromasses sont colorées en bleu alcian afin de visualiser les glycoaminoglycanes sulfatés (GAGs).

Une coloration au bleu alcian permet alors de visualiser les glycoaminoglycanes sulfatés (GAGs) exprimés au cours de la différenciation chondrogénique. Les micromasses cultivées en milieu contrôle sont très faiblement colorées (Figure 26). A l'inverse, les micromasses cultivées en milieu de différenciation ostéogénique sont fortement colorées en bleu, traduisant une forte expression de GAGs (Figure 26). Les hCSMs infectées avec des particules contrôles

ou shCaspase-3 réagissent de façon similaire à une différenciation chondrogénique (Figure 26).

L'extinction de cette protéine n'a aucune conséquence sur la différenciation chondrogénique. Par conséquent, le rôle de la Caspase-3 dans la différenciation des hCSMs semble spécifique à la voie ostéogénique.

3. Implication de Notch-1 dans la différenciation ostéogénique

La Caspase-3 semble impliquée dans les mécanismes de différenciation ostéogénique *via* son clivage par la Calpaïne. En effet, la Caspase-3 est clivée en fragments de 29 puis 25 kDa au cours de la différenciation. Nous nous sommes donc intéressés aux rôles des différents fragments et à leurs substrats de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique, principalement à ceux de la Caspase-3 p25. Les hCSMs sont alors nucléofectées avec des plasmides vides pcDNA3.1 ou codant pour la Caspase-3 p25. La différenciation ostéogénique est initiée 48h après la nucléofection des cellules. L'activité de phosphatase alcaline augmente au cours de la différenciation ostéogénique. Cependant, l'activité de la PAL est trois fois plus faible dans les cellules nucléofectées avec la Caspase-3 p25 soit 1, 5 Pi/min/ μ g contre 4, 5 Pi/min/ μ g pour les cellules contrôles (Figure 27).

Ces résultats sont surprenants car nous pensions que la présence de la Caspase-3 p25 faciliterait la différenciation ostéogénique. A l'inverse, nous observons une diminution de la capacité de différenciation dans les cellules Caspase-3 p25 (Figure 27).

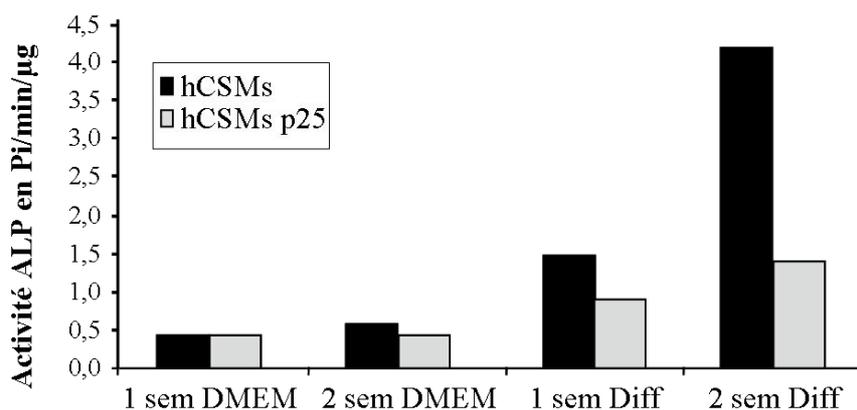


Figure 27 : La présence de Caspase-3 p25 retarde la différenciation ostéogénique.

Les hCSMs sont nucléofectées avec le plasmide vide pcDNA3.1 ou la Caspase-3 p25. Après deux semaines de culture en milieu complet ou de différenciation, l'activité de la phosphatase alcaline est mesurée.

Il a été décrit que l'activation constitutive de la voie Notch-1 dans des MC3T3 (MC3T3 surexprimant le fragment NICD) affectait la différenciation ostéogénique de ces cellules (Sciaudone et coll., 2003). Nous avons donc analysé l'activation de Notch-1 dans nos cellules. Effectivement, l'expression de la Caspase-3 p25 permet le clivage Notch-1 en NICD et provoque sa translocation nucléaire ainsi que son activation (Figure 28). Ce clivage peut expliquer le retard de différenciation ostéogénique dans les hCSMs nucléofectées avec la Caspase-3 p25. La Caspase-3 p25 activerait Notch-1 avant l'initiation de la différenciation ostéogénique de nos cellules et le NICD inhiberait alors ce processus.

A l'inverse, Cohen et ses collaborateurs ont démontré que les caspases-3 et -6 provoqueraient la dégradation du fragment NICD de Notch-1 dans des cellules Jurkat en apoptose (Cohen et coll., 2005). Dans le cas de la nucléofection par la Caspase-3 p25, il semblerait que le clivage de Notch-1 provoque son activation et non la dégradation du domaine NICD. En effet, d'une part la Caspase-3 p25 n'induit pas de mort cellulaire. D'autre part, les séquences consensus de la Caspase-3 p25 sont différentes de la Caspase-3 activée lors de l'apoptose. Il semble donc logique que le clivage de Notch-1 par la forme p25 n'implique pas la dégradation de cette protéine.

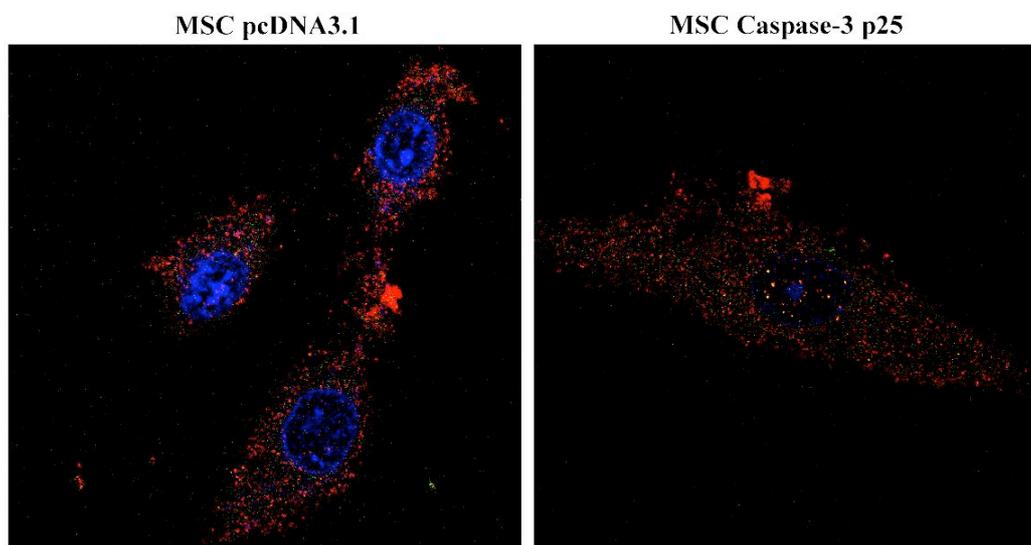


Figure 28 : La caspase-3 p25 active Notch-1.

Les hCSMs sont nucléofectées avec le plasmide vide pcDNA3.1 ou la Caspase-3 p25 puis cultivées en milieu complet. Après 3 jours, la protéine Notch-1 NICD est visualisée en rouge et le noyau en bleu (DRAQ5) en immunocytochimie.

Des travaux plus récents démontrent l'importance de Notch-1 dans la différenciation ostéogénique de ces cellules (Tezuka et coll., 2002) et dans l'augmentation du potentiel des BMP-2 (Nobta et coll., 2005). En effet, l'inhibition de la voie de transduction de Notch-1 par un dominant négatif de Notch-1 ou avec l'inhibiteur LY685, 458 diminue très fortement la phosphatase alcaline et la production d'ostéocalcine (Nobta et coll., 2005). Nous nous sommes donc intéressés à l'importance de Notch-1 dans la différenciation ostéogénique des hCSMs.

Pour cela, les hCSMs sont différenciées en présence ou pas d'inhibiteur de Notch-1, le DAPT. Comme décrit précédemment, l'activité de la phosphatase alcaline augmente au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs, jusqu'à 6 Pi/min/ μ g au bout de 14 jours de différenciation (Figure 29A). A l'inverse, lorsque ces cellules sont différenciées en présence de DAPT, cette enzyme est très faiblement activée, soit moins de 2 Pi/min/ μ g (Figure 29A). De même, les hCSMs forment des nodules minéraux au cours de leur différenciation mais la minéralisation est inhibée en présence de DAPT (Figure 29B).

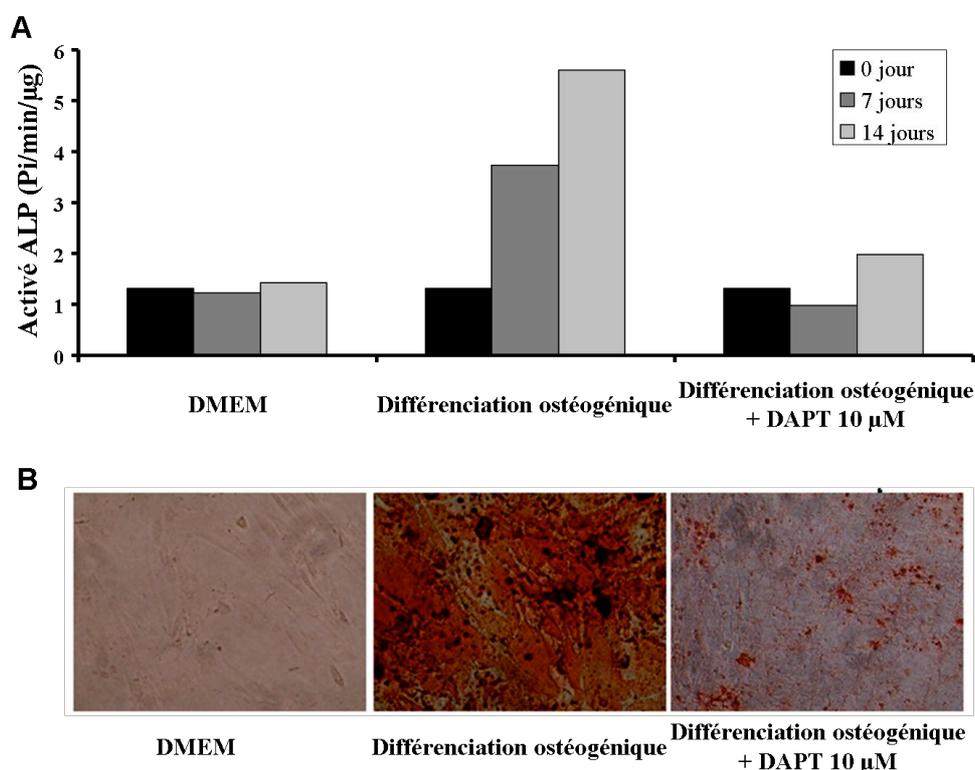


Figure 29 : L'inhibition de Notch-1 retarde la différenciation ostéogénique des hCSMs.

Les hCSMs sont différenciées en présence ou pas de DAPT à 10 μ M, inhibiteur de Notch-1 pendant 15 jours. Les marqueurs de différenciation ostéogénique sont étudiés : l'activité de la phosphatase alcaline (A) et la minéralisation par coloration en rouge alizarine (B).

Il apparait alors que l'activation de Notch-1 avant l'initiation de la différenciation inhibe ce processus physiologique dans les hCSMs Caspase-3 p25. Néanmoins, l'activation de Notch-1 est importante au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs car son inhibition retarde la différenciation. Ces résultats suggèrent alors une activation transitoire de Notch-1 au cours de la différenciation ostéogénique.

Les effets différents de l'activation de Notch-1 peuvent être dépendants de la période d'activation de Notch-1. Une activation courte et transitoire de la voie de transduction de Notch-1 participe à la différenciation ostéogénique (Tezuka et coll., 2002 ; Nobta et coll., 2005). A l'inverse, une activation longue et continue semble inhiber l'engagement ostéogénique des cellules (Sciaudone et coll., 2003).

Afin d'étudier plus précisément le rôle de Notch-1 dans la différenciation, les hCSMs devront être nucléofectées avec un plasmide codant pour la forme active de Notch-1, le NICD.

CHAPITRE III : SUBSTRATS DE LA CASPASE-3 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION OSTEOGENIQUE

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés aux substrats possibles de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation car, à l'heure actuelle, aucun substrat n'a été décrit pour cette forme. En effet, la plupart des substrats des Caspases ont été identifiées et une base de donnée a été réalisée par Alexander Lüthi et le laboratoire Martin, The CASBAH pour The CASpase Substrate dataBAse Homepage (Lüthi et Martin, 2007). Cependant, les substrats présents dans cette base ont été clivés par les caspases activées par la voie classique (voire introduction). Or, la Caspase-3 p25 est une forme d'activation atypique de la Caspase-3.

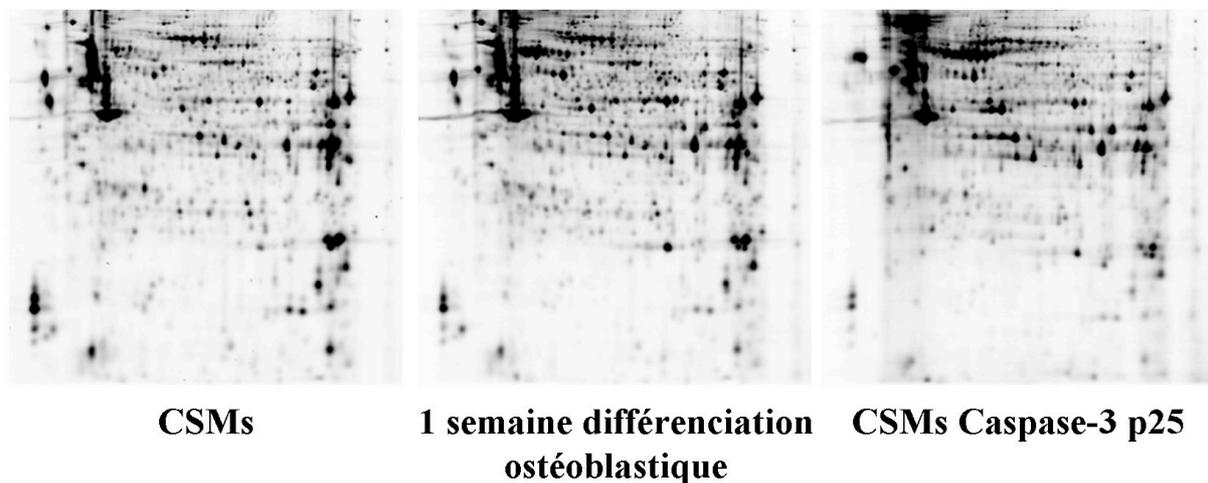


Figure 30 : Acquisition des gels de 2D-DIGE pour chaque échantillon.

Chaque gel représente le profil d'expression protéique de chacun des échantillons, les hCSMs, les hCSMs après une semaine de différenciation et les hCSMs exprimant la Caspase-2 p25. Les trois gels utilisés pour les analyses présentent des profils de migration similaire.

Pour mettre en évidence les substrats de la Caspase-3 p25 ainsi que ceux de la différenciation ostéogénique, nous comparons en 2D-DIGE les profils protéiques des hCSMs non différenciées, des hCSMs après 1 semaine de différenciation et des hCSMs nucléofectées avec la Caspase-3 p25. Pour cela, nous marquons les différents échantillons avec des fluorochromes CyDye (Cyanine Cy3 et Cy5). De plus, chaque réplicat biologique est marqué avec un fluorochrome différent afin de croiser les gels. Par exemple, 2 échantillons de CSMs sont marqués avec la cyanine Cy3 et 2 échantillons avec la cyanine Cy5. Afin de pouvoir

comparer les gels entre eux, un standard interne est réalisé avec une quantité constante de protéine de chaque échantillon. Le standard interne est marqué avec la cyanine Cy2.

L'électrophorèse bidimensionnelle consiste à séparer les protéines d'un échantillon selon deux paramètres, leur point isoélectrique par isofocalisation (IEF) puis leur poids moléculaire. Les images des gels sont alors acquises sur un scanner moléculaire Typhoon (Figure 30).

Tout d'abord, les gels sont alignés les uns sur les autres afin de réaliser une analyse différentielle des profils d'expression des protéines de chaque échantillon. Cette analyse est réalisée sur le logiciel "Progenesis SameSpots" et les spots différentiels possèdent les statistiques suivantes : Anova<0, 05, Fold>1, 3, Q-value<0, 01 et Power>0, 8. Nous avons ainsi mis en évidence 167 zones d'intérêt, zones représentées sur un des gels utilisé ultérieurement pour la suite de l'analyse (Figure 31).

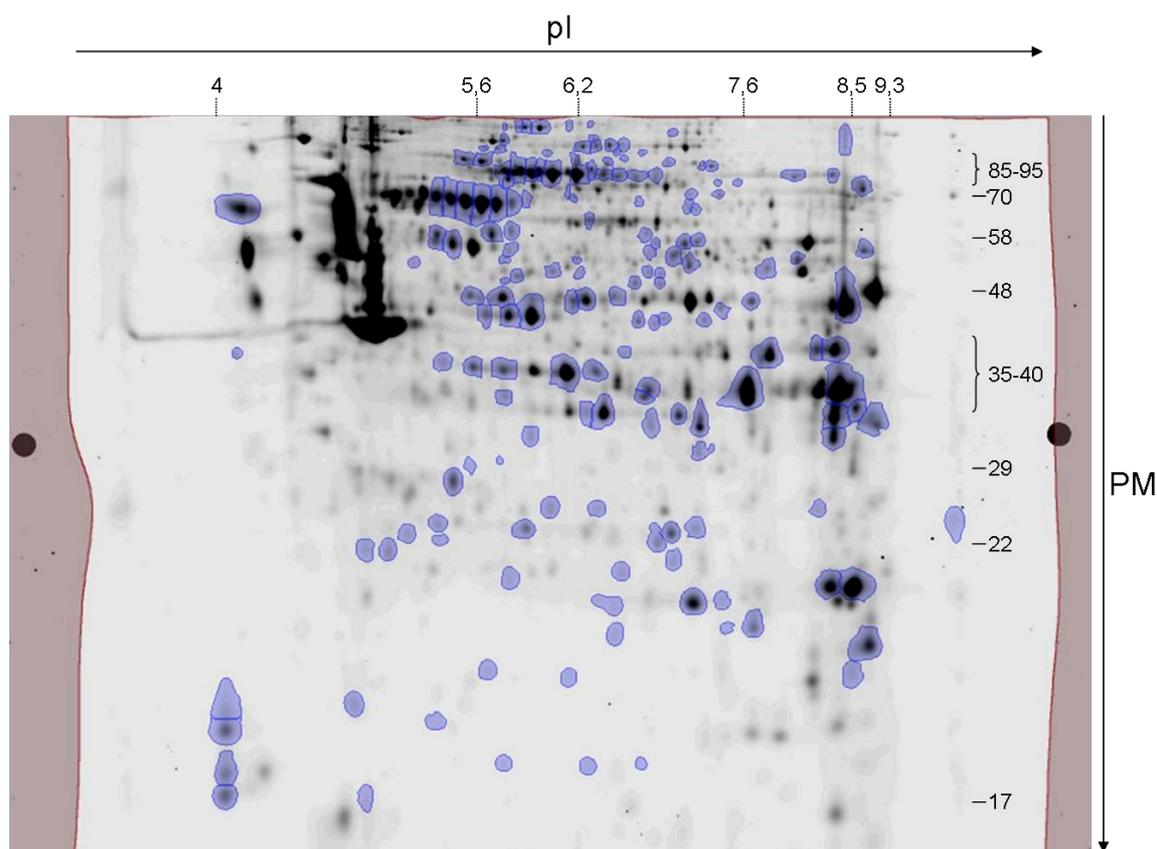


Figure 31 : Représentation des 167 zones d'intérêt avec l'analyse différentielle des échantillons.

Une analyse différentielle des profils d'expression des protéines de chaque échantillon est réalisée sur l'ensemble des gels avec le logiciel "Progenesis SameSpots". Les spots différentiels retenus possèdent les statistiques suivantes : Anova<0, 05, Fold>1, 3, Q-value<0, 01 et Power>0, 8. Ces zones seront extraites du gel par piquage robotisé puis analysée par MALDI TOF/TOF. Elles sont représentées en bleu sur la figure.

Ensuite, chaque zone est piquée sur 3 gels différents puis digérée afin d'obtenir des peptides. L'identification des protéines à partir de ces peptides est réalisée par spectrométrie de masse en tandem MS/MS sur le MALDI TOF/TOF. Les points isoélectriques (pI) et les masses moléculaires (MW) obtenues avec le MALDI TOF/TOF sont vérifiés avec la base de données d'ExPASy Compute pI/Mw tool. Cette base de données donne les points isoélectriques et les masses moléculaires théoriques des protéines identifiées. Nous validons alors les protéines ayant des points isoélectriques et des masses moléculaires identiques à leurs valeurs théoriques (Tableau 1).

	Identification MALDI-TOF-TOF	ID gel	TrEMBL	MW théorique	MW apparent	pI théorique	pI apparent
Protéines de stress Hsp	Hsp47 ou serpin H1 ^{a,b}	ID: 0501	P50454	44495	ok	8.81	ok
	Hsp 70 ^{c,d}	ID: 0300	P17066	70984	ok	5.81	ok
	Hsp 90 ou Hsp beta 1 ^{a,b}	ID: 0860	P04792	22768	ok	5.98	ok
Cytosquelette et protéines structurales	annexin A2 ^{a,d}	ID: 0670	P07355	38449	ok	7.56	ok
	caldesmon ^{c,d}	ID: 0140	Q05682	93194	ok	5.63	ok
	serum albumin ^{c,d}	ID: 0302	P02768	66429	ok	5.67	ok
	gelsolin ^{c,d}	ID: 0170	P06396	80678	ok	5.58	ok
	LASP ou LIM and SH3 domain protein 1 ^{c,d}	ID: 0733	Q14847	29698	ok	6.61	ok
Synthèse de l'ARN	EF-1G (Elongation Factor 1 gamma) ^{c,d}	ID: 0544	P26641	49956	ok	6.27	ok
	EF-Tu (Elongation Factor Tu) ^{a,d}	ID: 0574	P49411	45017	ok	6.31	ok
Epissage de l'ARN	hnRNP A1 ^{b,c}	ID: 0719	P09651	38691	ok	9.26	ok
	hnRNP A2/B1 ^{a,d}	ID: 0725	P22626	37407	ok	8.97	ok
	hnRNP H ou H2 ou F ^{c,d}	ID: 0507	P31943	49067	ok	5.89	ok
Protéines ribosomales	5'-3' exoribonuclease 1 ^a	ID: 0718	Q8IZH2	193985	35	6.78	6,2
	RPLP0 ou 60S acidic ribosomal protein P1 ^{a,b}	ID: 1056	P05386	11507	ok	4.26	ok
Enzymes	beta enolase ^{a,d}	ID: 0553	P13929	46826	45-48 kDa	7.73	7,6
	calmodulin ^{a,b}	ID: 1020	P62158	16696	ok	4.09	ok
	fructose bisphosphate aldolase A ^{a,b}	ID: 0625	P04075	39264	ok	8.39	ok
	FUSE-bp1 ^{a,b}	ID: 0303	Q96AE4	67518	ok	7.18	ok
	glyceraldehyde 3P dehydrogenase ^{a,b}	ID: 0664	P04406	35899	ok	8.58	ok
	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 ^{b,c}	ID: 0392	P13674	59073	ok	5.70	ok
	PSMF1 ou proteasome inhibitor PI31 ^{c,d}	ID: 0786	Q92530	29798	ok	5.42	5,5
	SOD2 (Mn), mitochondrial ^{a,d}	ID: 0924	P04179	22190	ok	6.86	ok
	triosephosphate isomerase ^{a,b}	ID: 0862	P60174	26522	25 kDa	6.51	6,5

Tableau 1 : Identification des protéines d'intérêt par analyse MALDI-TOF-TOF.

Ce tableau identifie le nom, le numéro d'identification, la masse moléculaire théorique et apparente, ainsi que le pI théorique et apparent de chaque protéine d'intérêt. De plus, les protéines sont classées par fonction cellulaires et les protéines en gras sont les substrats déjà connus de la Caspase-3. (**a** : protéines sous-exprimée dans les cellules Caspase-3 p25, **b** : protéines sous-exprimée dans les cellules différenciées, **c** : protéines surexprimée dans les cellules Caspase-3 p25, **d** : protéines surexprimée dans les cellules différenciées)

1. Identification des substrats de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation ostéogénique

Parmi les protéines identifiées, nous retrouvons des protéines de stress, des protéines structurales et du cytosquelette, des protéines participant à la synthèse et l'épissage des ARN tels que les facteurs d'élongation, les hnRNP (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein particule) et des protéines ribosomales, mais aussi des enzymes. Les protéines indiquées en gras sont les substrats connus des caspases et recensés dans la base de données CASBAH (Lüthi et Martin, 2007). Les références bibliographiques de ces clivages sont regroupées dans le tableau 2. Il est à noter que la plupart des clivages décrits ont été observé au cours de l'apoptose et non au cours d'une différenciation cellulaire.

	Uni Prot	Conséquences proposées de la protéolyse Caspase dépendante	Références bibliographiques	Site(s) de clivage Caspase dépendant
Calmodulin	PP2BA_HUMAN	Activation constitutive de la phosphatase ce qui déclenche l'activation de NF-AT et la libération d'IL-2	Mukerjee <i>et coll.</i> , 2000	DFGD (386)
Elongation factor 1 gamma	EF1G_HUMAN	Inconnue	Dix <i>et coll.</i> , 2008	EEMD (264)
Elongation factor Tu, mitochondrial	ETUD1_HUMAN	Inconnue	Mahrus <i>et coll.</i> , 2008	ELQDGCSE
Gelsolin	GELS_HUMAN	Perte de la liaison avec l'actine monomérique et dépolariation de la F-actine, bourgeonnement membranaire	Kothakota <i>et coll.</i> , 1997	DQTD (403)
hnRNP A1	ROA1_HUMAN	Inconnue	Brockstedt <i>et coll.</i> , 1998 Thiede <i>et coll.</i> , 2001	Inconnu
hnRNP A2/B1	ROA2_HUMAN	Diminution de la maturation des ARN	Brockstedt <i>et coll.</i> , 1998 Thiede <i>et coll.</i> , 2001	probables : SYND (262), KLTD (49)
hnRNP H ou F ou H2	HNRPF_HUMAN	Inconnue	Thiede <i>et coll.</i> , 2005	
Hsp70	HSP70_HUMAN	Inconnue	Mahrus <i>et coll.</i> , 2008	DHLDAADM
Hsp beta 1 (Hsp90)	HS90B_HUMAN	Inconnue	Prasad <i>et coll.</i> , 1998	DEED (259)
LASP1 (LIM and SH3 domain protein 1)	LASP1_HUMAN	Inconnue	Thiede <i>et coll.</i> , 2005	
RPLP0 (60S acidic ribosomal protein P1)	RLA0_HUMAN	Inconnue	Thiede <i>et coll.</i> , 2001	probables: PRED (5), EESD (308), SDED (310)

Tableau 2 4 : Protéines d'intérêt avec un clivage caspase-dépendant décrit dans la base de données CASBAH. Le tableau indique la conséquence du clivage de la protéine, les références bibliographiques concernées et le site de clivage quand il est connu.

Les protéines d'intérêt identifiées ne sont pas seulement des substrats potentiels de la Caspase-3 p25 et lors de la différenciation ostéogénique, mais également les protéines surexprimées dans ces deux conditions (Tableau 3). Les protéines en rouge sont les substrats possibles communs à la présence de la Caspase-3 p25 et à la différenciation ostéogénique.

Parmi elles, nous retrouvons principalement les protéines de stress, Hsp47 et Hsp90, le facteur de transcription EF-1 γ ainsi que les hnRNPs. Les protéines en bleu représentent les surexpressions communes aux deux conditions. Cependant, tous ces résultats ne sont que préliminaires à l'heure actuelle. Ils sont en cours de vérification par immunoempreinte.

	Substrats possibles de la Caspase-3 p25	Substrats possibles au cours de la différenciation	Surexpression en présence de la Caspase-3 p25	Surexpression au cours de la différenciation
Protéines de stress Hsp	Hsp47 ou serpin H1 Hsp 70 Hsp 90	Hsp47 ou serpin H1 Hsp 90	Hsp 70	Hsp 70
Cytosquelette et protéines structurales	Annexin A2 Caldesmon Gelsolin LASP ou LIM and SH3 domain protein 1		Serum albumin Caldesmon Gelsolin LASP	Annexin A2 Serum albumin Caldesmon Gelsolin LASP
Synthèse de l'ARN	EF-1G	EF-1G	EF-1G	EF-1G EF-Tu
Epissage de l'ARN	hnRNP A1 hnRNP A2/B1 hnRNP H ou H2 ou F	hnRNP A1 hnRNP A2/B1 hnRNP H ou H2 ou F	hnRNP A1 hnRNP H ou H2 ou F	hnRNP A1 hnRNP A2/B1 hnRNP H ou H2 ou F
Protéines ribosomales	5'-3' exoribonuclease 1 RPLP0			
Enzymes	beta enolase Calmodulin Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	Triosephosphate isomerase Calmodulin Fructose bisphosphate aldolase A Glyceraldehyde 3P dehydrogenase	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 PDIA3	PSMF1 ou proteasome inhibitor PI31 SOD2 (Mn), mitochondrial

Tableau 3 : Substrats possibles de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation ostéogénique.

Les protéines sont classées par fonction cellulaire selon qu'elles soient clivées ou surexprimées en présence de Caspase-3 p25 et au cours de la différenciation cellulaire. Les protéines en gras sont des substrats des Caspases déjà décrits dans la littérature. Les protéines en rouges sont les substrats potentiels qui sont communs à la présence de la Caspase-3 p25 et à la différenciation ostéogénique. Les protéines en bleu sont surexprimées et communes à la présence de la Caspase-3 p25 et à la différenciation ostéogénique.

Les protéines de stress Hsp (Heat shock protein) sont des protéines chaperonnes qui participent à la protection, le maintien et la régulation des fonctions des protéines auxquelles elles sont associées. Elles préviennent ainsi leur dénaturation lors de stress. Les protéines Hsp70 et Hsp90 ont été précédemment décrites comme substrats des caspases au cours de l'apoptose (Mahrus *et coll.*, 2008 ; Prasad *et coll.*, 1998). La protéine Hsp47 ou SerpinH1 appartient à la famille des SERPIN (Serine protéinase inhibitor) et protège le collagène. Les protéines Hsp47 et Hsp90 semblent être clivées en présence de Caspase-3 p25 au cours de la différenciation (tableau 3). A l'inverse, l'Hsp70 semble être clivée par la Caspase-3 p25, mais pas au cours de la différenciation (tableau 3). Le clivage de ces protéines chaperonnes permettrait alors de modifier les protéines qu'elles protègent tel que le collagène pour l'Hsp47. De plus, la surexpression de l'Hsp70 permettrait également de protéger les protéines néosynthétisées au cours de la différenciation et en présence de Caspase-3 p25

Par ailleurs, il semblerait que l'expression de la Caspase-3 p25 diminue fortement la maturation des ARN et la traduction dans les cellules, phénomène également observé dans les étapes précoces de la différenciation ostéogénique. En effet, nous observons un clivage des hnRNPs qui participent à la maturation et l'épissage des ARNt, du facteur EF-1 γ qui délivre normalement l'ARNt au ribosome, de la RLPL0 qui est une protéine ribosomale, de la 5'3'exoribonucléase qui extrait l'ARN du ribosome. Ces clivages sont similaires à ceux observés au cours de l'apoptose, ce qui conforte l'hypothèse que la différenciation cellulaire est une apoptose imparfaite. En effet, la plupart de ces protéines sont présentes dans la base de CASBAH : plusieurs hnRNPs comme le hnRNP-A1 (Brockstedt *et coll.*, 1998 ; Thiede *et coll.*, 2001), le hnRNP-A2/B1 (Brockstedt *et coll.*, 1998 ; Thiede *et coll.*, 2001), le facteur EF-1 γ (Dix *et coll.*, 2008), la RPLP0 (Thiede *et coll.*, 2001), la 5'3'exoribonucléase (Thiede *et coll.*, 2001). Par ailleurs, les clivages des hnRNP H/F/H2 et hnRNP-C1/C2 ont été décrits au cours de la maturation des macrophages. De plus, il a été décrit que le niveau d'expression du hnRNP-H diminuait au cours des étapes précoces de la différenciation myogénique de cellules souches (Liu *et coll.*, 2001). De plus, les auteurs montrent que l'inhibition de cette protéine stimule la différenciation des cellules. Le clivage de cette protéine permettrait ainsi aux cellules de s'engager vers la voie de différenciation ostéogénique. Cependant, tout comme pour Hsp70, l'expression de la Caspase-3 p25 ainsi que la différenciation ostéogénique stimule aussi l'expression de ce facteur d'élongation EF-1 γ ainsi que celle de EF-Tu. En effet,

les cellules ont également besoin de transcrire l'expression de nouveaux gènes, même si elles clivent les facteurs afin de réguler la transcription d'autres gènes.

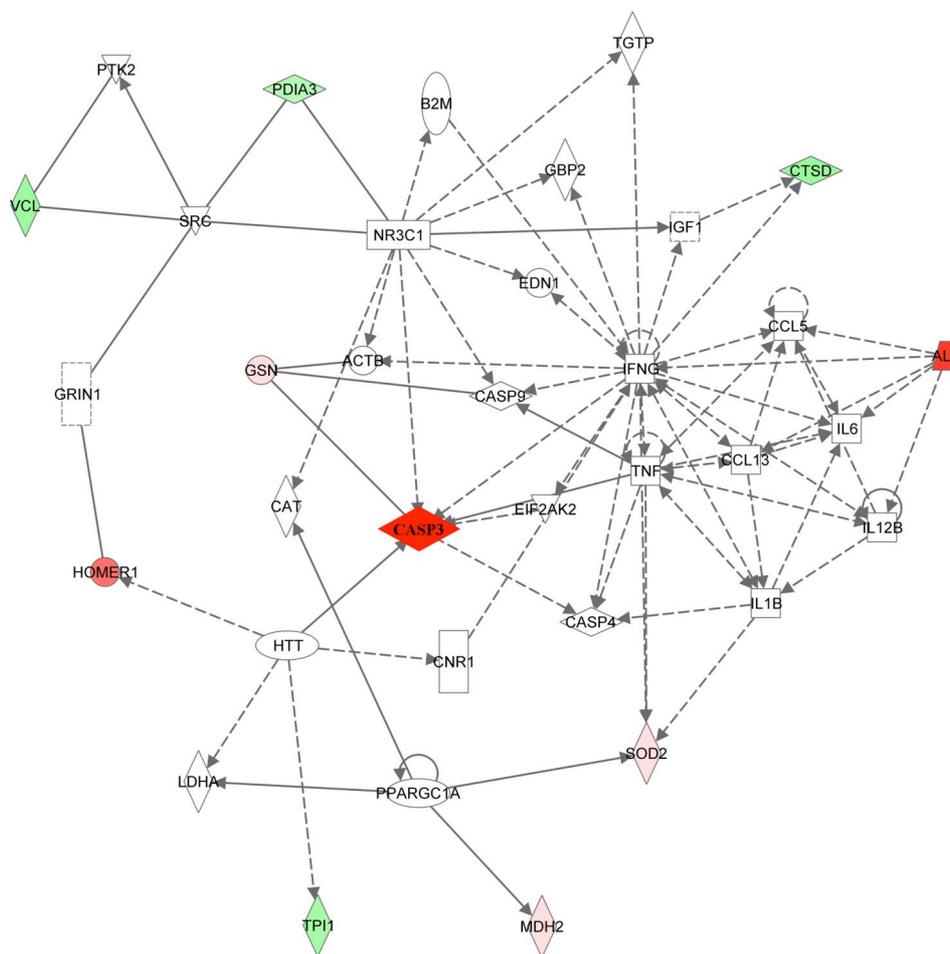
L'expression de la Caspase-3 p25 semble provoquer une réorganisation structurale des cellules. En effet, cette protéine cliverait plusieurs protéines du cytosquelette, telles que la gelsoline, la LASP1 et la caldesmon. En effet, la gelsoline régule l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine, la LASP1 (ou LIM and SH3 protein 1) organise le cytosquelette tandis que la caldesmon stabilise les filaments d'actine. Certaines de ces protéines sont également clivées au cours de l'apoptose telles la gelsoline (Kothakota et coll., 1997) et la LASP1 (Thiede et coll., 2005). Cependant, l'expression de la Caspase-3 p25 et la différenciation semblent également stimuler l'expression d'autres protéines du cytosquelette telles que l'albumine sérique, la caldesmon, la gelsoline et la LASP. La caldesmon stabiliserait donc les filaments d'actine pendant que la Gelsoline les assemblerait. Par ailleurs, l'albumine sérique est essentielle au maintien de la pression osmotique des cellules. Par conséquent, au cours de la différenciation ostéogénique et lors de l'expression de la Caspase-3 p25, nous avons une réorganisation du cytosquelette permettant un changement de morphologie cellulaire.

L'expression de la Caspase-3 p25 et la différenciation ostéogénique semblent provoquer le clivage de nombreuses enzymes cellulaires dont la calmoduline. Cette protéine est dépendante du calcium et régule un grand nombre de protéines, affectant ainsi plusieurs fonctions cellulaires (Chin et Means, 2000). Par exemple, la calmoduline est clivée par la Caspase-3 au cours de l'apoptose, ce qui provoque l'activation constitutive de phosphatase, du NF-AT et la libération de l'IL-2 (Mukerjee et coll., 2000). Le clivage de la calmodulin permettrait ainsi de lever l'inhibition de certaines de ces protéines cibles au cours des étapes précoces de la différenciation ostéogénique. Par ailleurs, il semblerait que l'expression de la Caspase-3 p25 stimule le clivage d'autres enzymes telles que la β -énolase, la prolyl-4-hydroxylase et l'aldéhyde déshydrogénase 10. De plus, la différenciation ostéogénique provoquerait le clivage de l'aldolase fructose biphosphate et de la triosephosphoisomérase. A l'inverse, la Caspase-3 p25 semble stimuler l'expression de la PDIA3 (protein disulfide isomerase family A, member 3) tandis que la différenciation augmenter celles du PSMF1 (Proteasome inhibitor subunit 1 ou PI31) et de la SOD2 (superoxide dismutase 2). A l'heure actuelle, l'ensemble de ces résultats sont préliminaires et il reste à les confirmer rapidement par immunoempreinte.

2. Réalisation de réseaux protéiques potentiellement activés au cours de la différenciation ostéogénique et en présence de la Caspase-3 p25

En parallèle de ces analyses, les données protéiques ont été chargées dans le logiciel Ingenuity Pathways IPA (Ingenuity systems, Redwood City, CA). Des réseaux biologiques ont alors été générés entre les protéines d'intérêt et la base de données du logiciel. Les réseaux obtenus sont représentés graphiquement sous forme de carte. L'index des protéines présentes dans les différents réseaux est situé dans l'annexe 1.

La figure 32 représente les réseaux protéiques potentiellement activés en présence de la Caspase-3 p25. Nous avons comparé les expressions protéiques entre les CSMs non différenciées et les cellules exprimant la Caspase-3 p25.



© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figure 32 : Réseau protéique possible en présence de la Caspase-3 p25 (Ingenuity systems).

Un réseau a été mis en évidence par le logiciel IPA. Parmi les protéines que nous avons identifiées et qui sont présentes dans ce réseau, cinq sont impliquées dans les interactions et

signalisation cellule-cellule, cinq autres sont de petites molécules biochimiques. Certaines participent au métabolisme des acides aminés, aux modifications post-transcriptionnelles et d'autres aux modifications post-translationnelles. La Caspase-3 est également présente au sein de ce réseau protéique.

La figure 33 représente les réseaux protéiques potentiellement activés au cours de la différenciation ostéogénique. En effet, nous avons comparé les expressions protéiques entre les CSMs non différenciées et les cellules ayant subi une semaine de différenciation. Deux réseaux principaux ont été mis en évidence au cours de la différenciation ostéogénique par le logiciel Ingenuity Pathways Systems. A travers ces réseaux, onze de nos protéines identifiées peuvent être impliquées dans la mort cellulaire, trois dans le cycle cellulaire (P21, P16, cycline B1), six dans la morphologie cellulaire et six peuvent compromettre la survie cellulaire. Ces réseaux indiquent également la présence d'interactions indirectes entre la Caspase-3 p25 et la protéine Notch-1 (en rouge sur le schéma du haut, figure 33). Néanmoins, seules les interactions directes et décrites plusieurs fois sont représentées dans la base "Ingenuity Pathways Knowledge Base" (IPKB). Or, à l'heure actuelle, une seule publication décrit une interaction directe entre la Caspase-3 et Notch (Cohen et coll., 2005). Ces réseaux nous encouragent donc à poursuivre l'étude des interactions entre la Caspase-3 p25 et Notch-1 au cours de la différenciation.

Les réseaux créés nous servent de document de travail et nous proposent de nouvelles perspectives à envisager.

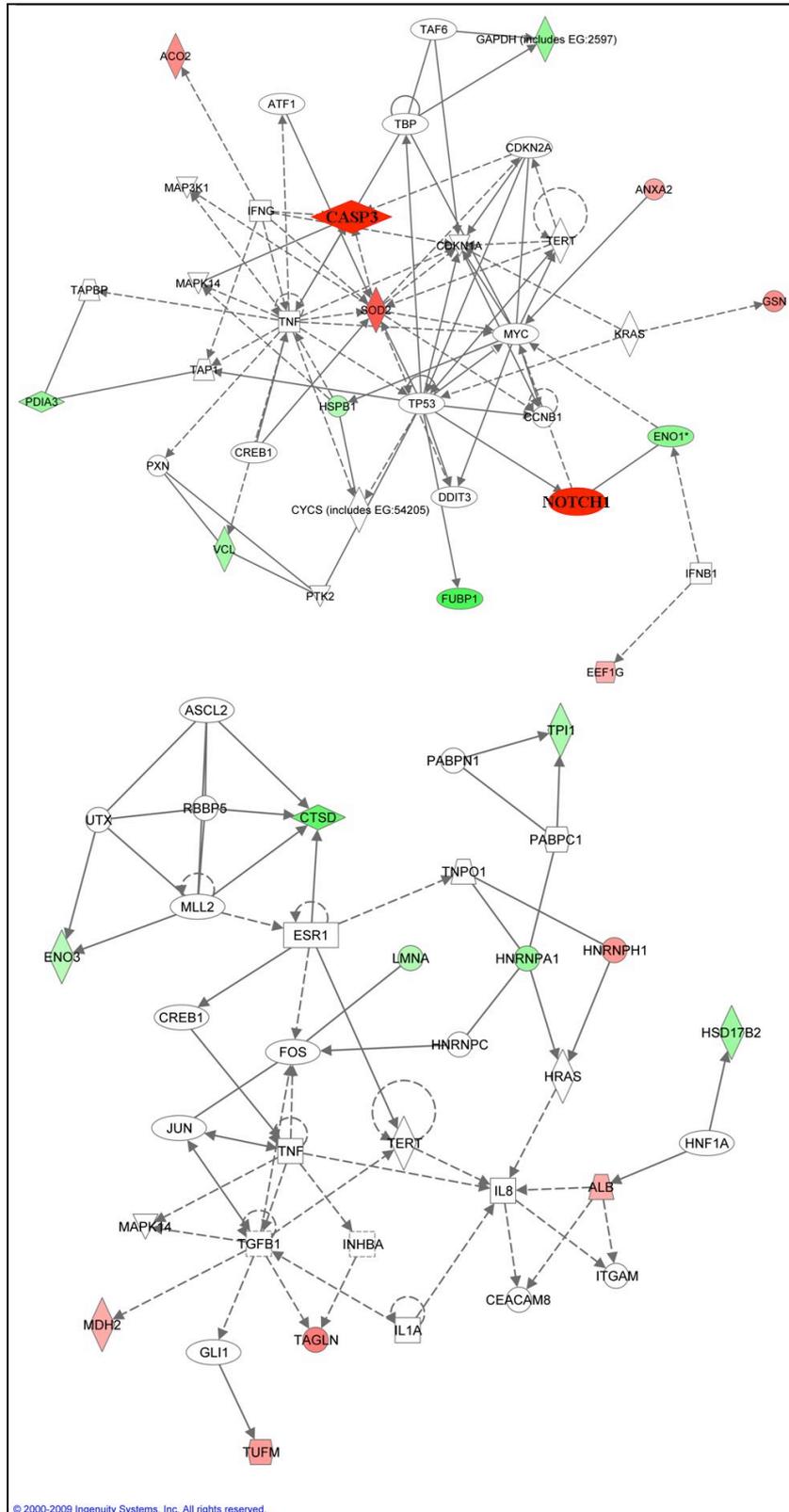


Figure 33 : Réseaux protéique potentiellement activés au cours de la différenciation ostéogénique (Ingenuity systems).

DISCUSSION

CONCLUSION

A. Etudes des mécanismes de mort cellulaire dans les cellules souches mésenchymateuses humaines (hCSMs)

Les hCSMs utilisées pour ces études sont capables d'autorenouvellement et de différenciation, assurant ainsi la longévité de la moelle osseuse (Figures 1 et 2). Le contrôle de l'intégrité de l'ADN est très important dans les hCSMs car la moindre altération génétique peut avoir des répercussions sur la différenciation et interférer avec les propriétés régénératives des hCSMs. Afin de limiter ces phénomènes, nous cultivons nos hCSMs après de courtes durées et avec un nombre de passage limité à 10. Nos hCSMs expriment les marqueurs de cellules souches CD90, CD44 et CD105 (Figure 1) (Dominici *et coll.*, 2006). Ces cellules possèdent également une forte capacité de réparation des dommages à l'ADN, ce qui leur confère une meilleure capacité de survie en réponse au stress

Les hCSMs adultes sont insensibles au mécanisme de mort cellulaire de type I. En effet, nous observons que les hCSMs utilisées résistent à des concentrations d'inducteurs d'apoptose tuant des cellules cancéreuses résistantes comme les K562 (lignée de CML ou chronic myelogenous leukemia) ou les cellules de gliomes humains (Figure 3). Leur cascade apoptotique semble donc non fonctionnelle. Cependant, nous montrons que nos cellules expriment les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bax, et les protéines essentielles à la phase effectrice de l'apoptose, les caspases initiatrices et effectrices (Figure 4). Au cours de l'apoptose, Bax subit des changements de conformation au cours de l'apoptose, notamment l'exposition de différents épitopes, qui permettent son adressage et son insertion à la mitochondrie (Cartron *et coll.*, 2003). Nous observons bien par immunocytochimie l'insertion de Bax à la mitochondrie mais aucun relargage mitochondrial de cytochrome c dans les hCSMs après l'activation de l'apoptose (Figure 4). La voie mitochondriale n'est donc pas fonctionnelle dans les hCSMs non différenciées. De plus, nous avons montré que les hCSMs expriment fortement les membres anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1, ce qui inhibe le relargage de protéines apoptogéniques de la mitochondrie (Figure 4). Il suffit de réprimer l'expression de la protéine Bcl-xL pour sensibiliser les hCSMs à l'étoposide. En effet, lorsque nous utilisons une approche shRNA dirigée contre Bcl-xL, nous sensibilisons nos cellules aux inducteurs d'apoptose. Néanmoins, cette sensibilité n'est pas totale car les hCSMs expriment toujours la protéine Mcl-1 (Figure 4). Par ailleurs, nous avons sensibilisé les cellules aux inducteurs d'apoptose après avoir initié leur différenciation que ce soit une différenciation ostéogénique, adipocytaire ou neurale (Figures 5, 6 et 7). Par ailleurs,

ces résultats ont été très récemment confirmés par l'équipe de Weinberg qui sensibilisent des CSCs mammaires à l'apoptose après les avoir engagées vers une différenciation épithéliale (Gupta *et coll.*, 2009).

Nous avons également montré par immunocytochimie que les hCSMs possèdent une forte capacité de réparation des dommages à l'ADN qui diminue au cours de la différenciation. En effet, le nombre de foci γ -H2AX diminue fortement en 24h pour les hCSMs non différenciées, à l'inverse du marquage dans les cellules différenciées (Figure 8). D'ailleurs, la diminution de cette capacité de réparation des dommages à l'ADN est également associée au vieillissement des cellules souches et à leur sensibilisation à l'apoptose (Yilmaz et Morrison, 2008). Cette propriété contribue donc à la résistance à l'apoptose des hCSMs lorsque cette dernière est induite par des traitements endommageant l'ADN.

A l'inverse, l'étude que nous avons menée sur le mécanisme de mort cellulaire de type II montre que les hCSMs sont sensibles aux stimuli autophagiques. En effet, nous avons observés par microscopie électronique à transmission la présence d'autophagolysosomes dans nos hCSMs en conditions normales. De plus, le nombre et la taille de ces vacuoles autophagique augmentent en conditions de carence nutritive (HBSS) (Figure 9). Nous avons également visualisé une augmentation du clivage de LC3, protéine clé dans la formation des autophagosomes. Au cours de la formation de ces autophagosomes, la protéine LC3-I cytoplasmique est insérée dans les doubles membranes où elle sera clivée en LC3-II au cours de la maturation des autophagosomes. Ainsi, le profil d'expression de LC3 traduit l'activité autophagique (Kabeya *et coll.*, 2000). Nos hCSMs présentent donc une forte activité basale mais également une forte capacité de réponse autophagique lors d'une carence nutritive (Figure 9). De plus, nous avons mis en évidence que l'autophagie était un programme de survie cellulaire pour les hCSMs et non un programme de mort cellulaire. En effet, si nous réprimons l'expression de la protéine Atg7, essentielle à la formation des autophagosomes, les hCSMs deviennent sensibles aux inducteurs d'apoptose (Figure 10). Par ailleurs, nous observons que l'activité autophagique basale des cellules diminue au cours de la différenciation (Figures 9 et 10). Il a été montré que la protéine anti-apoptotique Bcl-xL participe à la formation des autophagosomes au cours de la réponse autophagique (Shimizu *et coll.*, 2004). En effet, lorsque nous réprimons l'expression de Bcl-xL par ARN interférence, les hCSMs shBcl-xL perdent leur activité autophagique basale et leur capacité de réponse

autophagique à une carence nutritive. Nous observons également que les hCSMs shBcl-xL, tout comme les hCSMs shAtg7, deviennent sensibles aux stimuli apoptotiques, leur viabilité cellulaire diminue en présence d'étoposide. En effet, Bcl-xL est une protéine anti-apoptotique qui inhibe le relargage mitochondrial (Boise et Thompson, 1997), donc l'extinction de cette protéine favorise le processus apoptotique.

Tout comme la capacité de réparation des dommages à l'ADN, nous observons que la réponse autophagique diminue au cours de la différenciation des hCSMs. En effet, nous observons une diminution de l'activité protéolytique des cellules après induction de la différenciation par le BDNF (Figure 10), ce qui réduit d'autant la capacité de survie des hCSMs différenciées lors d'un stimulus apoptotique. De plus, nous observons que les hCSMs acquièrent une sensibilité aux inducteurs de mort au cours de la différenciation avec une activation de la Caspase-3 et la mort des cellules (Figure 5).

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 n'est pas exprimée dans les hCSMs non différenciées. Néanmoins, nous observons l'expression de cette protéine dès l'initiation de la différenciation cellulaire. La différenciation de ces cellules doit induire des modulations de la chromatine permettant l'expression de Bcl-2 au cours de ce processus cellulaire (Figure 13). Nous avons donc cherché à déstabiliser le statut épigénétique des hCSMs, méthylation et acétylation de l'ADN, afin que ces cellules expriment Bcl-2. Le promoteur de ce gène semble être désacétylé dans les hCSMs non différenciées. En effet, il nous a fallu inhiber les HDACs pour observer par immunoempreinte l'expression de cette protéine dans les cellules (Figure 14). La répression du promoteur de Bcl-2 permettrait la survie des hCSMs non différenciées. En effet, quand nous transfectons les hCSMs avec un plasmide codant pour Bcl-2, les hCSMs meurent. Ce phénomène pourrait être dû à la présence cytoplasmique du récepteur nucléaire orphelin Nur77 (ou NR4A1) car c'est un facteur nucléaire induisant la transcription de gènes de survie en conditions normales [pour revue, Moll *et coll.*, 2006]. De plus, Nur77 peut être présent au niveau du cytosol où il est associé au fragment NICD de Notch, ce qui le rend non apoptotique. Cependant, au cours de l'apoptose, les caspases clivent le domaine NICD et empêche l'association NICD/Nur77, ce qui rend alors Nur77 pro-apoptotique (Cohen *et coll.*, 2005). Par ailleurs, le Nur77 nucléaire peut également être phosphorylé au cours de l'apoptose causant sa translocation et son accumulation dans le cytosol (Li *et coll.*, 2000 ; Han *et coll.*, 2006). Dans ce cas, il se retrouve au niveau de la membrane mitochondriale, où il

pourrait se lier sur la boucle de Bcl-2 (Kolluri *et coll.*, 2008 ; Lin *et coll.*, 2004). Cette interaction induirait un changement conformationnel de Bcl-2 avec l'exposition de son domaine BH3, comme le montre le schéma de la Figure 17. Bcl-2 mimerait ainsi l'action des membres pro-apoptotiques «BH3-seulement» de la famille de Bcl-2. Bcl-2 pourra se dimériser avec les membres anti-apoptotiques *via* son domaine BH3 pour contrecarrer les actions de ces membres de la famille de Bcl-2 (Lin *et coll.*, 2004). Ce changement de conformation lèvera l'inhibition de Bcl-2 sur les membres pro-apoptotiques. Ainsi, son expression dans les hCSMs pourrait déplacer Notch-1 de Nur77, ce qui rendrait Nur77 et Bcl-2 pro-apoptotiques. Dans ce cas, la répression du gène *BCL2* dans les hCSMs non différenciées rendrait les cellules insensibles à une apoptose spontanée et permettrait leur survie cellulaire. Nous allons vérifier cette hypothèse par immunocytochimie après induction de l'expression de Bcl-2 dans nos cellules où nous étudierons alors la localisation de Nur77, de Notch et de Bcl-2 dans les cellules. De plus, nous regarderons la sensibilité de ces cellules pour les inducteurs d'apoptose en mesurant l'activité caspases.

La résistance des hCSMs aux inducteurs de mort cellulaire, leur forte capacité de réparation des dommages à l'ADN et de réponse autophagique permettent la survie à long terme de ces cellules et de conserver l'ensemble des propriétés des cellules souches. De plus, l'acquisition de la sensibilité à la mort cellulaire au cours de la différenciation permet une sauvegarde contre les dommages cellulaires. En effet, en cas de chimiothérapie ou de dommages cellulaires, les cellules différenciées déclenchent un processus apoptotique. A l'inverse, les hCSMs non différenciées sont protégées de ces dommages par leur résistance aux inducteurs de mort et leur forte capacité de réparation des dommages à l'ADN.

B. Rôle de la Caspase-3 au cours de la différenciation

1. Importance de la Caspase-3 au cours de la différenciation

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés au rôle de la Caspase-3 au cours de la différenciation cellulaire ainsi qu'aux substrats possibles de cette protéine. Outre son implication essentielle dans l'induction de la mort cellulaire programmée, de plus en plus d'exemples tendent à prouver que l'activation de la Caspase-3 ne conduit pas systématiquement à la mort cellulaire. La Caspase-3 est ainsi impliquée dans des processus divers et indépendants de l'apoptose tels que le processus inflammatoire, la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire [pour revue Chowdhury *et coll.*, 2008]. Pour chacun

de ces processus, l'expression de la Caspase-3 est transitoire et seulement une partie de la machinerie de l'apoptose est utilisée pendant la différenciation.

En 2008, les travaux des équipes de Zwaka et Scadden ont suggéré que la Caspase-3 agissait à différents moments de la vie des cellules souches hématopoïétiques (hCSH), affectant l'autorenouvellement et la différenciation de ces cellules (Fujita *et coll.*, 2008 ; Janzen *et coll.*, 2008). En effet l'équipe de Zwaka montre que la Caspase-3 limite la pluripotence des hCSHs par le clivage direct de la protéine Nanog. La Caspase-3 semble donc participer à la différenciation des cellules souches en limitant l'autorenouvellement de ces dernières (Fujita *et coll.*, 2008). L'équipe de Scadden montre également que la perte de la Caspase-3 provoque une réduction dramatique de la maturation des lymphocytes B, étape nécessitant l'arrêt de l'autorenouvellement (Janzen *et coll.*, 2008).

Plusieurs équipes décrivent l'importance de la Caspase-3 pour la différenciation ostéogénique. Des souris déficientes en Caspase-3 présentent des défauts osseux dès les étapes précoces du développement (Miura *et coll.*, 2004). La Caspase-3 joue donc un rôle critique *in vivo* dans les processus de développement et de remodelage osseux (Miura *et coll.*, 2004), d'autant que les cellules provenant de ces souris ont une capacité de prolifération et un potentiel de différenciation ostéogénique diminués (Miura *et coll.*, 2004). Il a également été montré que la Caspase-3 était nécessaire à la différenciation ostéogénique *in vitro* de la lignée ostéoblastique MC3T3-E1 (Mogi et Togari, 2003). Cependant, les auteurs décrivent un clivage de la procaspase-3 en fragment de 18 kDa au cours de la différenciation ostéogénique chez la souris (Mogi et Togari, 2003). Ce clivage est celui décrit au cours de l'apoptose. Or, nous n'observons pas de fragment de 18 kDa par immunoempreinte dans nos cellules, mais un clivage de la procaspase-3 en des fragments de 29 puis 25 kDa (Figure 16). Ce clivage de la Caspase-3 est décrit comme étant catalysé par la calpaïne (Pelletier *et coll.*, 2005). De plus, nous empêchons le clivage de la procaspase-3, par inhibition de la calpaïne par l'ALLN, au cours de la différenciation ostéogénique de nos hCSMs (Figure 16).

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à l'implication de la calpaïne au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs. La calpaïne est une protéase à cystéine responsable de la protéolyse neutre calcium-dépendante. En effet, la calpaïne possède un domaine, fortement homologue à la calmoduline, lui permettant d'interagir avec le calcium. Cette protéine a déjà été décrite comme régulant ce processus de différenciation ostéogénique (Murray *et coll.*, 1997a). Nous observons une activation de la calpaïne dans les étapes très

précoces de la différenciation ostéogénique des hCSMs. En effet, son activité est mesurée dès 2 jours de différenciation, que ce soit en mesurant son activité par fluorométrie ou par marquage *in vivo* avec un substrat fluorogénique de cette protéine (Figure 17). Nous avons observé que l'inhibition prolongée de la calpaïne par l'ALLN diminuait très fortement la capacité de différenciation ostéogénique des hCSMs (Figure 18). Cette dernière est déterminée par l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) et la minéralisation de la matrice de ces cellules. La PAL, catalysant la réduction du β -glycérophosphate en phosphate inorganique, permet alors la minéralisation de la matrice cellulaire. Lorsque nous traitons nos cellules avec l'ALLN, nous mesurons une très faible activité de la PAL par rapport aux hCSMs différenciées sans cet inhibiteur (Figure 18). Par conséquent, il est normal que nous visualisions également une minéralisation moins importante dans les cellules différenciées en présence d'ALLN (Figure 18). Les mêmes résultats ont été observés au cours de la différenciation ostéogénique des cellules murines MC3T3-E1 en présence d'inhibiteur irréversible des protéases à cystéine, l'E64d (Murray *et coll.*, 1997b), confirmant ainsi l'implication de la calpaïne dans la différenciation ostéogénique des hCSMs. Notre analyse des gels natifs a mis en évidence des complexes protéiques de 180 kDa qui nous suggèrent une association entre la calpaïne (80 kDa et 30 kDa) et la Caspase-3 (32 kDa) au cours de la différenciation ostéogénique (Figure 19).

Du fait de l'importance de la calpaïne dans la différenciation ostéogénique, nous nous sommes, ensuite, intéressés à son substrat, la Caspase-3, car la calpaïne permet son clivage en fragment de 29 et 25 kDa (Figure 16). Nous nous sommes alors concentrés sur le rôle de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs. Pour cela, nous avons utilisé une approche ARN interférence dirigée contre la Caspase-3 (Figures 20 et 21). L'ensemble des hCSMs infectées avec les particules contrôles et shCaspase-3 présentent une augmentation de l'activité de la PAL tout au long de la différenciation ostéogénique. La Caspase-3 ne semble donc pas essentielle à la différenciation ostéogénique (Figure 22). Cependant, l'activité de la PAL et la minéralisation sont beaucoup moins importantes en l'absence de Caspase-3 (Figures 22 et 23). En effet, la minéralisation est quasi inexistante dans les cellules n'exprimant plus la Caspase-3. Nous avons alors émis l'hypothèse que la Caspase-3 pouvait réguler l'expression du gène de la PAL. Or, de façon surprenante, l'analyse transcriptionnelle de ce gène nous a révélé que les cellules dépourvues de Caspase-3

expriment plus fortement les ARNm codant pour la PAL et le MGP que les cellules contrôles (Figure 24). Malgré l'expression de la PAL, les cellules dépourvues de Caspase-3 semblent dans l'impossibilité de former des nodules minéraux.

Ces résultats nous ont conduits à l'étude de l'expression des protéines de morphogénèse osseuse que sont les protéines BMP-2 qui participe également à la minéralisation de la matrice cellulaire (Suzuki *et coll.*, 2006). En effet, nos résultats montrent que l'expression transcriptionnelle de la BMP-2 augmente progressivement au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs contrôles (Figure 24). Au contraire, l'expression de BMP-2 est constante dans les cellules dépourvues de Caspase-3. La stimulation de la minéralisation est donc moins importante dans ces cellules. Cependant, l'expression de cette protéine à une semaine de différenciation est similaire pour les hCSMs exprimant ou pas la Caspase-3 et cette expression semble suffisante pour réguler l'expression du principal facteur ostéogénique Cbfa1/Runx2. En effet, les profils d'expression du facteur de transcription Cbfa1/Runx2 sont identiques pour les cellules contrôles et shCaspase-3 (Figure 24). Or, ce facteur est essentiel dans l'engagement et la différenciation des ostéoblastes (Ducy *et coll.*, 1997) car ce facteur possède un domaine de liaison à l'ADN de type Runt/Cbfa. Il se lie à un site consensus présent dans le promoteur de nombreux gènes dont la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type I, l'ostéocalcine (OCN) et l'ostéopontine (OPN). Son acétylation augmente alors l'activité transcriptionnelle de Cbfa1/Runx2 dans les hCSMs et les engagent vers la voie ostéoblastique (Jeon *et coll.*, 2006). Or l'expression seule de Cbfa1/Runx2 n'est pas suffisante pour induire une différenciation terminale des ostéoblastes car il n'y a pas de minéralisation osseuse dans les cellules n'exprimant plus la Caspase-3. Cette protéine semble donc réguler les étapes tardives de la différenciation ostéogénique.

L'absence de minéralisation de la matrice que nous observons en l'absence de Caspase-3 pourrait être due à une déficience de la phosphatase alcaline et/ou à une faible expression de BMP2 au cours de la différenciation ostéogénique de ces cellules. Nous avons donc traité les hCSMs avec du phosphate inorganique (Pi) et de la protéine BMP-2 purifiée (Suzuki *et coll.*, 2006) afin de compenser la déficience d'activité de la phosphatase alcaline et le manque de BMP-2 des hCSMs shCaspase-3.

La présence de ces deux molécules augmente fortement la minéralisation au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs exprimant ou pas la Caspase-3. Néanmoins, la

minéralisation que nous observons dans les cellules shCaspase-3 différenciées en présence de BMP-2 et de Pi est toutefois plus faible que celle obtenue pour les hCSMs contrôles dans les mêmes conditions (Figure 25). De plus, la phosphatase alcaline est moins fonctionnelle dans les cellules shCaspase-3. En effet, les minéralisations matricielles que nous obtenons avec les traitements Pi et BMP-2 sont à peine similaires à la minéralisation obtenue dans les hCSMs contrôles en milieu de différenciation basique. L'extinction de la Caspase-3 semble ainsi rendre la phosphatase alcaline non fonctionnelle, ce qui retarde la différenciation ostéogénique dans les hCSMs shCaspase-3.

L'implication de la Caspase-3 dans la différenciation des hCSMs semble spécifique à la voie ostéogénique. En effet, l'extinction de cette protéine dans les hCSMs n'a aucune conséquence sur la différenciation chondrogénique de nos cellules (Figure 26). De plus, à l'heure actuelle, aucun article n'implique la Caspase-3 au cours de la différenciation chondrocytaire contrairement à la différenciation ostéogénique (comme décrit précédemment). Nous avons mis en évidence que la Caspase-3 était importante mais non essentielle à la différenciation ostéogénique des hCSMs. En effet, l'extinction de cette protéine retarde la différenciation ostéogénique mais ne l'abolit pas complètement. Il semblerait qu'une voie alternative à la Caspase-3 puisse être mise en place au cours de la différenciation afin de compenser l'extinction de la Caspase-3 dans les hCSMs.

2. Rôle de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation ostéogénique

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la forme de 25 kDa, au vu du clivage atypique de la Caspase-3 au cours de la différenciation ostéogénique (Pelletier *et coll.*, 2005). En effet, la procaspase-3 est clivée par la calpaïne en fragments de 29 puis en 25 kDa, l'inhibition de cette dernière empêchant le clivage de la procaspase-3 (Figure 16). Nous avons ainsi nucléofectées les hCSMs avec un plasmide codant pour la forme 25 kDa de la Caspase-3. Cette forme apparaissant après 4 jours de différenciation, nous pensions que son expression dans les hCSMs augmenterait la capacité de différenciation des hCSMs. A l'inverse, la nucléofection de la Caspase-3 p25 diminue le potentiel de différenciation de nos cellules. En effet, l'activité de la PAL est trois fois plus faible lors de l'expression de la Caspase-3 p25 que dans les hCSMs (Figure 27). Par ailleurs, nous avons observé en immunocytochimie que l'expression de la Caspase-3 p25 permettait la translocation nucléaire de Notch-1. Cette translocation nucléaire résulte du clivage de Notch-1 en fragment NICD, ce qui conduit à

l'activation de Notch-1 dans les cellules exprimant la Caspase-3 p25 (Figure 28). Néanmoins, nous ne savons pas à l'heure actuelle si le clivage de Notch-1 résulte d'une interaction directe avec la Caspase-3 p25 où s'il est dépendant des γ -sécrétases. En effet, le site de clivage de Notch-1 par la Caspase-3 p25 n'a pas encore été décrit. Actuellement, seuls les travaux de l'équipe de Sékaly montre que la Caspase-3 dégrade le fragment NICD de Notch au niveau de plusieurs sites de clivage au cours de l'apoptose. (Cohen *et coll.*, 2005). Ce clivage de Notch est catalysé par l'hétérotétramère actif p17/p12 de la Caspase-3. Dans le cas de la nucléofection par la Caspase-3 p25, il semble que le clivage de Notch provoque son activation et non la dégradation du domaine NICD (Cohen *et coll.*, 2005). En effet, d'une part la Caspase-3 p25 n'induit pas la mort de nos cellules, d'autre part, les séquences consensus reconnues de la Caspase-3 p25 doivent être différentes de la Caspase-3 activée lors de l'apoptose. En effet, au cours de l'apoptose, la Caspase-3 active est un hétérodimère p17/p12. A l'inverse, la Caspase-3 n'est plus activable pour l'apoptose après un clivage en p29 ou p25 (Pelletier *et coll.*, 2005). Les sites actifs des différentes formes de la Caspase-3 sont donc vraisemblablement différents. Il nous semble donc logique que le clivage de Notch en présence de la Caspase-3 p25 n'implique pas la dégradation de cette protéine. Par la suite, il nous reste à déterminer si le clivage de Notch en présence de Caspase-3 est direct ou indirect. Pour cela, nous envisageons de réaliser des essais *in vitro* entre la Caspase-3 p25 et Notch-1 afin de voir si un clivage de Notch-1 peut être obtenu dans ces conditions. De plus, nous projetons de réaliser des études de nucléofection avec la Caspase-3 p25 sur les hCSMs et d'inhibition des γ -sécrétases, afin de voir si nous observons toujours la translocation nucléaire du NICD.

L'activation de Notch avant l'initiation de la différenciation pourrait expliquer le retard de différenciation ostéogénique observé dans les hCSMs nucléofectées avec la Caspase-3 p25. En effet, il a été décrit que l'activation constitutive de Notch dans les MC3T3-E1 affectaient la différenciation ostéogénique des cellules MC3T3-E1 (Sciaudone *et coll.*, 2003). Cette équipe montre qu'une activation longue et continue inhibe l'engagement ostéoblastique des cellules (Sciaudone *et coll.*, 2003). Afin de vérifier cette hypothèse, nous réaliserons des nucléofections des hCSMs avec un plasmide codant pour le fragment NICD de Notch avant d'analyser la capacité de différenciation de ces cellules par coloration rouge alizarine et par mesure de l'activité de la phosphatase alcaline.

De plus, certains travaux ont décrit une activation courte et transitoire de la voie de transduction de Notch au cours de la différenciation ostéogénique (Tezuka *et coll.*, 2002 ; Nobta *et coll.*, 2005). Afin de vérifier l'importance de l'activation transitoire de Notch au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs, nous avons différencié nos cellules en présence d'un inhibiteur de Notch, le DAPT. En présence de cette molécule, les hCSMs perdent leur capacité de différenciation. En effet, il n'y a ni activation de la phosphatase alcaline ni minéralisation de la matrice pour les cellules différenciées en présence de cette drogue (Figure 29). La voie de signalisation de Notch semble donc être activée de façon transitoire au cours de la différenciation ostéogénique des hCSMs. Il nous reste à confirmer ces résultats par une cinétique du clivage de Notch au cours de la différenciation ostéogénique en immunocytochimie et en immunoempreinte.

En résumé, nous observons que l'initiation de la différenciation ostéogénique des hCSMs active la calpaïne après 2 jours de traitement. Cette protéine va alors cliver la procaspase-3 en fragments successifs de 29 kDa puis 25 kDa. La présence de la Caspase-3 p25 dans les cellules permettra alors l'activation de la protéine Notch et la relocalisation nucléaire de son fragment NICD qui aboutira à la différenciation ostéogénique des hCSMs.

3. Substrats possibles de la Caspase-3 p25 au cours de la différenciation

Nous avons cherché à mettre en évidence les substrats de la Caspase-3 p25 par une approche protéomique. En effet, les séquences consensus reconnues par la Caspase-3 p25 doivent être différentes de la Caspase-3 activée lors de l'apoptose, l'hétérodimère p17/p12. Les sites actifs des différentes formes de la Caspase-3 sont vraisemblablement différents. A l'heure actuelle, nous avons quelques candidats mais ce sont des résultats préliminaires, qui devront être validés. En effet, la présence de la Caspase-3 p25, tout comme les étapes précoces de la différenciation ostéogénique, semble provoquer le clivage de nombreuses protéines intervenant dans la traduction des ARN, que ce soit des protéines intervenant dans la maturation des ARNt, des facteurs d'élongation, des protéines ribosomales et la 5'3'exoribonucléase. Par ailleurs, la présence de la Caspase-3 p25 et la différenciation ostéogénique provoquent une restructuration du cytoplasme, largement décrit au cours des processus de différenciation cellulaire. De plus, il semble y avoir des modifications de fonctions cellulaires avec le clivage de nombreuses enzymes.

Néanmoins, les réseaux protéiques obtenus à partir des données de la 2D-DIGE semblent indiquer des interactions entre la Caspase-3 et le Notch-1, même si elles ne semblent pas directes. En effet, le logiciel ne crée des réseaux protéiques qu'à partir de données bibliographiques publiées plusieurs fois. Or, les interactions directes entre ces deux protéines n'ont été décrits qu'une seule fois (Cohen *et coll.*, 2005). Cette piste est donc à vérifier comme je le préciser précédemment.

En résumé, la résistance des hCSMs aux inducteurs de mort cellulaire, leur forte capacité de réparation des dommages à l'ADN et de réponse autophagique permettent la survie à long terme de ces cellules et de conserver l'ensemble des propriétés des cellules souches. De plus, l'acquisition de la sensibilité à la mort cellulaire au cours de la différenciation permet une sauvegarde contre les dommages cellulaires. En effet, en cas de chimiothérapie ou de dommages cellulaires, les cellules différenciées déclenchent un processus apoptotique. A l'inverse, les hCSMs non différenciées sont protégées de ces dommages par leur résistance aux inducteurs de mort et leur forte capacité de réparation des dommages à l'ADN.

De plus, nous avons mis en évidence que la Caspase-3 était importante mais non essentielle à la différenciation ostéogénique des hCSMs. En effet, l'extinction de cette protéine retarde la différenciation ostéogénique mais ne l'abolit pas complètement, même si cette dernière est très faible. Il semblerait qu'une voie alternative à la Caspase-3 puisse être mise en place au cours de la différenciation afin de compenser l'extinction de la Caspase-3 dans les hCSMs. De plus, nous avons montré que l'initiation de la différenciation ostéogénique des hCSMs active la calpaïne dès les étapes précoces de ce processus cellulaire. Cette protéine va alors cliver la procaspase-3 en fragments successifs de 29 kDa puis 25 kDa. La présence de la Caspase-3 p25 dans les cellules permettra alors l'activation de la protéine Notch et la relocalisation nucléaire de son fragment NICD qui aboutira à la différenciation ostéogénique des hCSMs. Cependant, il reste à découvrir le mécanisme d'activation de Notch-1 en présence de la Caspase-3 p25. Par ailleurs, il semblerait que la Caspase-3 participe aux étapes précoces de la différenciation cellulaire où elle est présente sous la forme de 25 kDa. La Caspase-3 p25 ne peut pas être activée lors de la cascade apoptotique, or nous pouvons mesurer une activité apoptotique de la Caspase-3 dès 2 semaines de différenciation. C'est donc une fois la différenciation bien engagée que la Caspase-3 deviendrait une protéine pro-apoptotique.

Par ailleurs, l'approche protéomique de la Caspase-3 p25 a fourni de nombreuses pistes sur les substrats possibles de cette protéine. En effet, aucun substrat n'a été décrit à l'heure actuelle. De plus, la même approche pourra être utilisée pour découvrir les substrats potentiels de la Caspase-3 p29. Une fois ces substrats identifiés, il faudra alors déterminer les sites de clivage de ces enzymes. Ces résultats sont très prometteurs et fournissent de nombreuses pistes à explorer quand aux rôles des protéines impliquées dans la différenciation ostéogénique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQU
ES

- Acampora, D., Merlo, G. R., Paleari, L., Zerega, B., Postiglione, M. P., Mantero, S., Bober, E., Barbieri, O., Simeone, A. et Levi, G. (1999). Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development (Cambridge, England)*, *126*, 3795-809.
- Adams, G. B., Chabner, K. T., Alley, I. R., Olson, D. P., Szczepiorkowski, Z. M., Poznansky, M. C., Kos, C. H., Pollak, M. R., Brown, E. M. et Scadden, D.T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*, *439*, 599-603.
- Ailles, L. E. et Weissman, I.L. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Current opinion in biotechnology*, *18*, 460-6.
- Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y. et Tsujimoto, Y. (1994). Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer research*, *54*, 2468-71.
- Akita, K., Ohtsuki, T., Nukada, Y., Tanimoto, T., Namba, M., Okura, T., Takakura-Yamamoto, R., Torigoe, K., Gu, Y., Su, M. S., Fujii, M., Satoh-Itoh, M., Yamamoto, K., Kohno, K., Ikeda, M. et Kurimoto, M. (1997). Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. *The Journal of biological chemistry*, *272*, 26595-603.
- Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S. et Sékaly, R.P. (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *The Journal of experimental medicine*, *190*, 1879-90.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. et Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, *87*, 171.
- Amabile, G. et Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends in molecular medicine*, *15*, 59-68.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G. Y. et Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, *118*, 149-61.
- Arama, E., Agapite, J. et Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Developmental cell*, *4*, 687-97.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J. C., Cecconi, F. et Youle, R.J. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *The EMBO journal*, *22*, 4385-99.
- Assefa, Z., Vantighem, A., Garmyn, M., Declercq, W., Vandenabeele, P., Vandenheede, J. R., Bouillon, R., Merlevede, W. et Agostinis, P. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial cytochrome c release in ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, *275*, 21416-21.
- Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D. K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T. E., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Witte, L., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F. et Rafii, S. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine*, *10*, 64-71.
- Baba, Y., Yokota, T., Spits, H., Garrett, K. P., Hayashi, S. et Kincade, P.W. (2006). Constitutively active beta-catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*, 2294-303.
- Bailey, A. S., Jiang, S., Afentoulis, M., Baumann, C. I., Schroeder, D. A., Olson, S. B., Wong, M. H. et Fleming, W.H. (2004). Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*, *103*, 13-9.
- Banfi, A., Bianchi, G., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R. et Quarto, R. (2002). Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue engineering*, *8*, 901-10.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D. et Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*, 756-60.
- Barnhart, B. C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G. et Peter, M.E. (2004). CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO journal*, *23*, 3175-85.

- Barnoy, S. et Kosower, N.S. (2003). Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS letters*, 546, 213-7.
- Barry, F., Boynton, R. E., Liu, B. et Murphy, J.M. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental cell research*, 268, 189-200.
- Barry, M., Heibin, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R. et Bleackley, R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and cellular biology*, 20, 3781-94.
- Beevers, C. S., Li, F., Liu, L. et Huang, S. (2006). Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 119, 757-64.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U. et Beier, C.P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer research*, 67, 4010-5.
- Beisner, D. R., Ch'en, I. L., Kolla, R. V., Hoffmann, A. et Hedrick, S.M. (2005). Cutting edge: innate immunity conferred by B cells is regulated by caspase-8. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175, 3469-73.
- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J. et Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced Autophagy is mediated through HIF-induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3-domains. *Molecular and cellular biology*, , .
- Bennett, J. H., Joyner, C. J., Triffitt, J. T. et Owen, M.E. (1991). Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *Journal of cell science*, 99 (Pt 1), 131-9.
- Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T. et Seglen, P.O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *The Journal of biological chemistry*, 273, 21883-92.
- Bertin, J., Armstrong, R. C., Otilie, S., Martin, D. A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G. H., Senkevich, T. G., Alnemri, E. S., Moss, B., Lenardo, M. J., Tomaselli, K. J. et Cohen, J.I. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1172-6.
- Bianco, P. et Gehron Robey, P. (2000). Marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation*, 105, 1663-8.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J. et Miller, L.K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of virology*, 68, 2521-8.
- Birnbaum, T., Roeder, J., Schankin, C. J., Padovan, C. S., Schichor, C., Goldbrunner, R. et Straube, A. (2007). Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of neuro-oncology*, 83, 241-7.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. et Vescovi, A.L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 283, 534-7.
- Blagosklonny, M. V. (2001). Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 15, 869-74.
- Blagosklonny, M. V., Giannakakou, P., el-Deiry, W. S., Kingston, D. G., Higgs, P. I., Neckers, L. et Fojo, T. (1997). Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer research*, 57, 130-5.
- Boatright, K. M. et Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, 15, 725-31.
- Boiret, N., Rapatel, C., Veyrat-Masson, R., Guillaouard, L., Guérin, J., Pigeon, P., Descamps, S., Boisgard, S. et Berger, M.G. (2005). Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Experimental hematology*, 33, 219-25.
- Boise, L. H. et Thompson, C.B. (1997). Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 3759-64.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H. et Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *The Journal of biological chemistry*, 270, 7795-8.
- Booth, C. et Potten, C.S. (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *The Journal of clinical investigation*, 105, 1493-9.
- Boquest, A. C., Shahdadfar, A., Frønsdal, K., Sigurjonsson, O., Tunheim, S. H., Collas, P. et Brinchmann, J.E. (2005). Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Molecular biology of the cell*, 16, 1131-41.

- Borner, C., Olivier, R., Martinou, I., Mattmann, C., Tschopp, J. et Martinou, J.C. (1994). Dissection of functional domains in Bcl-2 alpha by site-directed mutagenesis. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 72, 463-9.
- Bosch, P., Musgrave, D., Ghivizzani, S., Latterman, C., Day, C. S. et Huard, J. (2000). The efficiency of muscle-derived cell-mediated bone formation. *Cell transplantation*, 9, 463-70.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R., Casares, N., Perfettini, J., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. et Kroemer, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 25, 1025-40.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. et Young, R.A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947-56.
- Bozanić, D., Tafra, R. et Saraga-Babić, M. (2003). Role of apoptosis and mitosis during human eye development. *European journal of cell biology*, 82, 421-9.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H. et Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-6.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 678-89.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. et Blau, H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290, 1775-9.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A. M. et Dimmeler, S. (2000). Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Molecular and cellular biology*, 20, 1886-96.
- Brighton, C. T. et Krebs, A.G. (1972). Oxygen tension of healing fractures in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 54, 323-32.
- Brockstedt, E., Rickers, A., Kostka, S., Laubersheimer, A., Dörken, B., Wittmann-Liebold, B., Bommert, K. et Otto, A. (1998). Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *The Journal of biological chemistry*, 273, 28057-64.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. et Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 15, 269-90.
- Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P. et et al. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, 269, 1885-8.
- Burdon, T., Smith, A. et Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in cell biology*, 12, 432-8.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringham, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M. et Scadden, D.T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425, 841-6.
- Caplan, A. I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*, 213, 341-7.
- Carlisle, G. W., Smith, D. H. et Wiedmann, M. (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood*, 103, 4310-6.
- Carmody, R. J. et Cotter, T.G. (2000). Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell death and differentiation*, 7, 282-91.
- Cartron, P., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K. et Vallette, F.M. (2003). Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 23, 4701-12.
- Cartron, P., Priault, M., Oliver, L., Meflah, K., Manon, S. et Vallette, F.M. (2003). The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *The Journal of biological chemistry*, 278, 11633-41.
- Castedo, M., Perfettini, J., Roumier, T. et Kroemer, G. (2002). Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation*, 9, 1287-93.
- Castedo, M., Perfettini, J., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. et Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825-37.
- Cecconi, F. et Levine, B. (2008). The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Developmental cell*, 15, 344-57.
- Cerni, C. (2000). Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutation research*, 462, 31-47.
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A. et et al. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 256, 97-100.

- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A. et Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer cell*, *9*, 351-65.
- Chambers, I. et Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, *23*, 7150-60.
- Chang, D. W., Ditsworth, D., Liu, H., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S. et Yang, X. (2003). Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *The Journal of biological chemistry*, *278*, 16466-9.
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J. et Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*, *7*, 821-30.
- 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. et Huang, D.C.S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell*, *17*, 393-403.
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C. et Gottlieb, R.A. (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *The Journal of biological chemistry*, *276*, 30724-8.
- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K. et Hardwick, J.M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, *278*, 1966-8.
- Cheng, N., Janumyan, Y. M., Didion, L., Van Hofwegen, C., Yang, E. et Knudson, C.M. (2004). Bcl-2 inhibition of T-cell proliferation is related to prolonged T-cell survival. *Oncogene*, *23*, 3770-80.
- Chiba, S. (2006). Notch signaling in stem cell systems. *Stem cells*, *24*, 2437-47.
- Chin, D. et Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in cell biology*, *10*, 322-8.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. et Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, *81*, 505-12.
- Chittenden, H. B., Clearkin, L. G. et Sidky, K. (1995). Herpes zoster ophthalmicus masquerading as giant cell arteritis. *British journal of hospital medicine*, *54*, 49-50.
- Choi, B. H. et Lapham, L.W. (1980). Evolution of Bergmann glia in developing human fetal cerebellum: a Golgi, electron microscopic and immunofluorescent study. *Brain research*, *190*, 369-83.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. et Bhat, G.K. (2008). Caspases - an update. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, *151*, 10-27.
- Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, *21*, 5483-95.
- Chung, E. J., Hwang, S., Nguyen, P., Lee, S., Kim, J., Kim, J. W., Henkart, P. A., Bottaro, D. P., Soon, L., Bonvini, P., Lee, S., Karp, J. E., Oh, H. J., Rubin, J. S. et Trepel, J.B. (2002). Regulation of leukemic cell adhesion, proliferation, and survival by beta-catenin. *Blood*, *100*, 982-90.
- Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A. et Hardwick, J.M. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*, 554-9.
- Codogno, P. et Meijer, A.J. (2006). Atg5: more than an autophagy factor. *Nature cell biology*, *8*, 1045-7.
- Cohen, L. Y., Bourbonnière, M., Sabbagh, L., Bouchard, A., Chew, T., Jeannequin, P., Lazure, C. et Sékaly, R. (2005). Notch1 antiapoptotic activity is abrogated by caspase cleavage in dying T lymphocytes. *Cell death and differentiation*, *12*, 243-54.
- Cohen, Z., Wilson, J., Ritter, L. et McDonagh, P. (2004). Caspase inhibition decreases both platelet phosphatidylserine exposure and aggregation: caspase inhibition of platelets. *Thrombosis research*, *113*, 387-93.
- Counis, M. F., Chaudun, E., Arruti, C., Oliver, L., Sanwal, M., Courtois, Y. et Torriglia, A. (1998). Analysis of nuclear degradation during lens cell differentiation. *Cell death and differentiation*, *5*, 251-61.
- Covello, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C., Labosky, P. A., Simon, M. C. et Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development*, *20*, 557-70.
- Croall, D. E. et McGrody, K.S. (1994). Domain structure of calpain: mapping the binding site for calpastatin. *Biochemistry*, *33*, 13223-30.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Roos, B. A. et Schiller, P.C. (2006). Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*, *39*, 513-22.
- Dahm, R. (1999). Lens fibre cell differentiation - A link with apoptosis?. *Ophthalmic research*, *31*, 163-83.

- Dahm, R., Gribbon, C., Quinlan, R. A. et Prescott, A.R. (1998). Changes in the nucleolar and coiled body compartments precede lamina and chromatin reorganization during fibre cell denucleation in the bovine lens. *European journal of cell biology*, 75, 237-46.
- Dahmane, N. et Ruiz i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development (Cambridge, England)*, 126, 3089-100.
- Daido, S., Kanzawa, T., Yamamoto, A., Takeuchi, H., Kondo, Y. et Kondo, S. (2004). Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer research*, 64, 4286-93.
- Daniels, D. L. et Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology*, 12, 364-71.
- Das, S., Srikanth, M. et Kessler, J.A. (2008). Cancer stem cells and glioma. *Nature clinical practice. Neurology*, 4, 427-35.
- De Bari, C., Dell'Accio, F. et Luyten, F.P. (2001). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis and rheumatism*, 44, 85-95.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. et Luyten, F.P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism*, 44, 1928-42.
- De Boer, J., Wang, H. J. et Van Blitterswijk, C. (2004). Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*, 10, 393-401.
- De Botton, S., Sabri, S., Daugas, E., Zermati, Y., Guidotti, J. E., Hermine, O., Kroemer, G., Vainchenker, W. et Debili, N. (2002). Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, 100, 1310-7.
- De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Testa, U. et Peschle, C. (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 401, 489-93.
- DeChant, A. K., Dee, K. et Weyman, C.M. (2002). Raf-induced effects on the differentiation and apoptosis of skeletal myoblasts are determined by the level of Raf signaling: abrogation of apoptosis by Raf is downstream of caspase 3 activation. *Oncogene*, 21, 5268-79.
- Deans, R. J. et Moseley, A.B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*, 28, 875-84.
- Del Bello, B., Valentini, M. A., Zunino, F., Comporti, M. et Maellaro, E. (2001). Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*, 20, 4591-5.
- Deltour, S., Chopin, V. et Leprince, D. (2005). [Epigenetics and cancer]. *Medecine sciences : M/S*, 21, 405-11.
- Denault, J. et Salvesen, G.S. (2002). Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical reviews*, 102, 4489-500.
- Deng, W. et Lin, H. (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Developmental biology*, 189, 79-94.
- Deng, X., Ito, T., Carr, B., Mumby, M. et May, W.S.J. (1998). Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatins 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry*, 273, 34157-63.
- Derfoul, A., Perkins, G. L., Hall, D. J. et Tuan, R.S. (2006). Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem cells*, 24, 1487-95.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. et Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of cell biology*, 144, 891-901.
- Deveraux, Q. L. et Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development*, 13, 239-52.
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S. et Reed, J.C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *The EMBO journal*, 18, 5242-51.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. et Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO journal*, 17, 2215-23.
- Diekert, K., de Kroon, A. I., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., de Kruijff, B. et Lill, R. (2001). Apocytocrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *The EMBO journal*, 20, 5626-35.

- Ding, W., Ni, H., Gao, W., Hou, Y., Melan, M. A., Chen, X., Stolz, D. B., Shao, Z. et Yin, X. (2007). Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *The Journal of biological chemistry*, 282, 4702-10.
- Dings, J., Jäger, A., Meixensberger, J. et Roosen, K. (1998). Brain tissue pO₂ and outcome after severe head injury. *Neurological research*, 20 Suppl 1, S71-5.
- Dix, M. M., Simon, G. M. et Cravatt, B.F. (2008). Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell*, 134, 679-91.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. et Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- Dove, S. K., Piper, R. C., McEwen, R. K., Yu, J. W., King, M. C., Hughes, D. C., Thuring, J., Holmes, A. B., Cooke, F. T., Michell, R. H., Parker, P. J. et Lemmon, M.A. (2004). Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. *The EMBO journal*, 23, 1922-33.
- Droin, N. M. et Green, D.R. (2004). Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1644, 179-88.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. et Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. et Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-54.
- Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J. M., Willert, K., Gaiano, N. et Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nature immunology*, 6, 314-22.
- Dunn, W. A. J. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of cell biology*, 110, 1935-45.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. et Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*, 68, 383-424.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. et Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell death and differentiation*, 16, 966-75.
- Ellis, R. E., Jacobson, D. M. et Horvitz, H.R. (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 129, 79-94.
- Er, E., Oliver, L., Cartron, P., Juin, P., Manon, S. et Vallette, F.M. (2006). Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochimica et biophysica acta*, 1757, 1301-11.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. et Martinou, J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and cellular biology*, 20, 929-35.
- Evan, G. et Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281, 1317-22.
- Evans, M. J. et Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- Evans, S. M., Judy, K. D., Dunphy, I., Jenkins, W. T., Hwang, W., Nelson, P. T., Lustig, R. A., Jenkins, K., Magarelli, D. P., Hahn, S. M., Collins, R. A., Grady, M. S. et Koch, C.J. (2004). Hypoxia is important in the biology and aggression of human glioblastoma tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 8177-84.
- Eymin, B., Sordet, O., Droin, N., Munsch, B., Haugg, M., Van de Craen, M., Vandenabeele, P. et Solary, E. (1999). Caspase-induced proteolysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mediates its anti-apoptotic activity. *Oncogene*, 18, 4839-47.
- Fadeel, B., Hassan, Z., Hellström-Lindberg, E., Henter, J. I., Orrenius, S. et Zhivotovsky, B. (1999). Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 13, 719-28.
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*, 4, 263-73.
- Fedele, A. O., Whitelaw, M. L. et Peet, D.J. (2002). Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Molecular interventions*, 2, 229-43.
- Fengsrud, M., Erichsen, E. S., Berg, T. O., Raiborg, C. et Seglen, P.O. (2000). Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *European journal of cell biology*, 79, 871-82.
- Fernando, P., Brunette, S. et Megeney, L.A. (2005). Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19, 1671-3.

- Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R. S. et Megey, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 11025-30.
- Fischer, U., Jänicke, R. U. et Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation*, *10*, 76-100.
- Flanagan, J. G. (1999). Life on the road. *Nature*, *401*, 747-8.
- Fleming, W. H., Alpern, E. J., Uchida, N., Ikuta, K. et Weissman, I.L. (1993). Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*, 3760-4.
- Foley, J. D., Rosenbaum, H. et Griep, A.E. (2004). Temporal regulation of VEID-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin cleavage activity and caspase-6 correlates with organelle loss during lens development. *The Journal of biological chemistry*, *279*, 32142-50.
- Forsyth, N. R., Musio, A., Vezzoni, P., Simpson, A. H. R. W., Noble, B. S. et McWhir, J. (2006). Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning and stem cells*, *8*, 16-23.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. et Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, *3*, 393-403.
- Fromm, L. et Overbeek, P.A. (1997). Inhibition of cell death by lens-specific overexpression of bcl-2 in transgenic mice. *Developmental genetics*, *20*, 276-87.
- Frost, V., Al-Mehairi, S. et Sinclair, A.J. (2001). Exploitation of a non-apoptotic caspase to regulate the abundance of the cdk1 p27(KIP1) in transformed lymphoid cells. *Oncogene*, *20*, 2737-48.
- Frost, V., Delikat, S., Al-Mehairi, S. et Sinclair, A.J. (2001). Regulation of p27KIP1 in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines involves non-apoptotic caspase cleavage. *The Journal of general virology*, *82*, 3057-66.
- Fuchs, E., Tumber, T. et Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, *116*, 769-78.
- Fujita, J., Crane, A. M., Souza, M. K., Dejosez, M., Kyba, M., Flavell, R. A., Thomson, J. A. et Zwaka, T.P. (2008). Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *2*, 595-601.
- Fujita, N. et Tsuruo, T. (1998). Involvement of Bcl-2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, *246*, 484-8.
- Fujita, N., Nagahashi, A., Nagashima, K., Rokudai, S. et Tsuruo, T. (1998). Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene*, *17*, 1295-304.
- Fulton, A. B., Prives, J., Farmer, S. R. et Penman, S. (1981). Developmental reorganization of the skeletal framework and its surface lamina in fusing muscle cells. *The Journal of cell biology*, *91*, 103-12.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, *287*, 1433-8.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. et Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer research*, *64*, 7011-21.
- Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, S. A., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J., Martin, S. J., Medema, J. P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U. M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D. W., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H., Steller, H., Tschoop, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Vousden, K. H., Youle, R. J., Yuan, J., Zhivotovsky, B. et Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*, , .
- Gehron Robey, P. (1989). The biochemistry of bone. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, *18*, 858-902.
- Geisbrecht, E. R. et Montell, D.J. (2004). A role for Drosophila IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell*, *118*, 111-25.
- Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D. et Allen, H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, *386*, 619-23.

- Gibbons, J., Hewitt, E. et Gardner, D.K. (2006). Effects of oxygen tension on the establishment and lactate dehydrogenase activity of murine embryonic stem cells. *Cloning and stem cells*, 8, 117-22.
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. et Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature cell biology*, 2, 156-62.
- Grandgirard, D., Studer, E., Monney, L., Belser, T., Fellay, I., Borner, C. et Michel, M.R. (1998). Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *The EMBO journal*, 17, 1268-78.
- Graves, J. D., Draves, K. E., Craxton, A., Krebs, E. G. et Clark, E.A. (1998). A comparison of signaling requirements for apoptosis of human B lymphocytes induced by the B cell receptor and CD95/Fas. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161, 168-74.
- Grayson, W. L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B. et Ma, T. (2006). Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *Journal of cellular physiology*, 207, 331-9.
- Green, D. R. et Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626-9.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. et Sul, H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews*, 78, 783-809.
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W. et Gimble, J.M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology*, 189, 54-63.
- Gu, Y., Filippi, M., Cancelas, J. A., Siefring, J. E., Williams, E. P., Jasti, A. C., Harris, C. E., Lee, A. W., Prabhakar, R., Atkinson, S. J., Kwiatkowski, D. J. et Williams, D.A. (2003). Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science*, 302, 445-9.
- Guillemin, K. et Krasnow, M.A. (1997). The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell*, 89, 9-12.
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A. et Lander, E.S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 138, 645-59.
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J. et van der Goot, F.G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*, 126, 1135-45.
- Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J. L., Poellinger, L., Lendahl, U. et Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Developmental cell*, 9, 617-28.
- Haldar, S., Basu, A. et Croce, C.M. (1997). Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer research*, 57, 229-33.
- Haldar, S., Jena, N. et Croce, C.M. (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4507-11.
- Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M. et Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 11333-8.
- Han, Y., Cao, X., Lin, B., Lin, F., Kolluri, S. K., Stebbins, J., Reed, J. C., Dawson, M. I. et Zhang, X. (2006). Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt. *Oncogene*, 25, 2974-86.
- Hatten, M. E. (1987). Neuronal inhibition of astroglial cell proliferation is membrane mediated. *The Journal of cell biology*, 104, 1353-60.
- Hay, N. et Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, 18, 1926-45.
- Hay, E., Lemonnier, J., Modrowski, D., Lomri, A., Lasmoles, F. et Marie, P.J. (2000). N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *Journal of cellular physiology*, 183, 117-28.
- Hedge, V. L. et Williams, G.T. (2002). Commitment to apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha is dependent on caspase activity. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 7, 123-32.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A. S., Werb, Z. et Rafii, S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 109, 625-37.
- Henderson, S. T., Gao, D., Lambie, E. J. et Kimble, J. (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 120, 2913-24.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- Hirsch, T., Dallaporta, B., Zamzami, N., Susin, S. A., Ravagnan, L., Marzo, I., Brenner, C. et Kroemer, G. (1998). Proteasome activation occurs at an early, premitochondrial step of thymocyte apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161, 35-40.
- Hoffman, R. M. (2005). In vivo cell biology of cancer cells visualized with fluorescent proteins. *Current topics in developmental biology*, 70, 121-44.

- Hofmann, K., Bucher, P. et Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in biochemical sciences*, 22, 155-6.
- Hristov, M., Erl, W. et Weber, P.C. (2003). Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends in cardiovascular medicine*, 13, 201-6.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M. et Hsueh, A.J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 12401-6.
- Hu, S. et Yang, X. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *The Journal of biological chemistry*, 278, 10055-60.
- Hu, S., Vincenz, C., Buller, M. et Dixit, V.M. (1997). A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 272, 9621-4.
- Huang, J. I., Kazmi, N., Durbhakula, M. M., Hering, T. M., Yoo, J. U. et Johnstone, B. (2005). Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 23, 1383-9.
- Huang, Y. Z. et Mei, L. (2001). [Neuregulin/ErbB signal transduction pathway in the development of nervous system]. *Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology]*, 32, 197-203.
- Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G. et Wu, H. (2003). Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *The Journal of biological chemistry*, 278, 49517-22.
- Huh, J. R., Vernooy, S. Y., Yu, H., Yan, N., Shi, Y., Guo, M. et Hay, B.A. (2004). Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for Drosophila spermatid individualization. *PLoS biology*, 2, E15.
- Hung, S., Chen, N., Hsieh, S., Li, H., Ma, H. et Lo, W. (2002). Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem cells*, 20, 249-58.
- Hunter, J. J. et Parslow, T.G. (1996). A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 271, 8521-4.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. et Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408, 488-92.
- Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G. et Kimchi, A. (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *The Journal of cell biology*, 157, 455-68.
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. et Núñez, G. (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10717-22.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. et Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-5.
- Ishizaki, Y., Jacobson, M. D. et Raff, M.C. (1998). A role for caspases in lens fiber differentiation. *The Journal of cell biology*, 140, 153-8.
- Jackson, K. A., Mi, T. et Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 14482-6.
- Jang, Y. et Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 110, 3056-63.
- Janumyan, Y. M., Sansam, C. G., Chattopadhyay, A., Cheng, N., Soucie, E. L., Penn, L. Z., Andrews, D., Knudson, C. M. et Yang, E. (2003). Bcl-xL/Bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *The EMBO journal*, 22, 5459-70.
- Janzen, V., Fleming, H. E., Riedt, T., Karlsson, G., Riese, M. J., Lo Celso, C., Reynolds, G., Milne, C. D., Paige, C. J., Karlsson, S., Woo, M. et Scadden, D.T. (2008). Hematopoietic stem cell responsiveness to exogenous signals is limited by caspase-3. *Cell Stem Cell*, 2, 584-94.
- Jauch, R., Ng, C. K. L., Saikatendu, K. S., Stevens, R. C. et Kolatkar, P.R. (2008). Crystal structure and DNA binding of the homeodomain of the stem cell transcription factor Nanog. *Journal of molecular biology*, 376, 758-70.
- Jeon, E., Lee, K., Choi, N., Lee, M., Kim, H., Jin, Y., Ryoo, H., Choi, J., Yoshida, M., Nishino, N., Oh, B., Lee, K., Lee, Y. H. et Bae, S. (2006). Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *The Journal of biological chemistry*, 281, 16502-11.

- Jiang, X. et Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *The Journal of biological chemistry*, 275, 31199-203.
- Joazeiro, C. A. et Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 102, 549-52.
- Johnson, C. R. et Jarvis, W.D. (2004). Caspase-9 regulation: an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 9, 423-7.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. et Yoo, J.U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research*, 238, 265-72.
- Jones, D. L. et Wagers, A.J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, 11-21.
- Joo, K. M., Kim, S. Y., Jin, X., Song, S. Y., Kong, D., Lee, J., Jeon, J. W., Kim, M. H., Kang, B. G., Jung, Y., Jin, J., Hong, S., Park, W., Lee, D., Kim, H. et Nam, D. (2008). Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 88, 808-15.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. et Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*, 19, 5720-8.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. et Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology*, 150, 1507-13.
- Kang, T., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogev, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., Ramakrishnan, P., Lapidot, T. et Wallach, D. (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173, 2976-84.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I. M., Kondo, Y. et Kondo, S. (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*, 24, 980-91.
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., Richardson, A. L., Polyak, K., Tubo, R. et Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449, 557-63.
- Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Ozato, K. et Guroff, G. (2000). Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nature cell biology*, 2, 435-40.
- Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. et Nagata, S. (2001). Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*, 292, 1546-9.
- Kelekar, A., Chang, B. S., Harlan, J. E., Fesik, S. W. et Thompson, C.B. (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Molecular and cellular biology*, 17, 7040-6.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. et Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26, 239-57.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. et Yoshimori, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO reports*, 2, 330-5.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J. et Cheng, E.H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature cell biology*, 8, 1348-58.
- Kim, J. K., Kim, K. S., Ahn, J. Y., Kim, N. K., Chung, H. M., Yun, H. J. et Cha, K.Y. (2004). Enhanced apoptosis by a novel gene, Bak-like, that lacks the BH3 domain. *Biochemical and biophysical research communications*, 316, 18-23.
- Kimble, J. E. et White, J.G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 81, 208-19.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. et Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal*, 14, 5579-88.
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S. et Camougrand, N. (2004). Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 279, 39068-74.
- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T. et Ackerman, S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, 419, 367-74.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A. J., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. et Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell*, 5, 539-45.

- Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O. et Rubinsztein, D.C. (2008). Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes?. *Autophagy*, 4, 849-950.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R. et Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275, 1132-6.
- Kolluri, S. K., Bruey-Sedano, N., Cao, X., Lin, B., Lin, F., Han, Y., Dawson, M. I. et Zhang, X. (2003). Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Molecular and cellular biology*, 23, 8651-67.
- Kolluri, S. K., Zhu, X., Zhou, X., Lin, B., Chen, Y., Sun, K., Tian, X., Town, J., Cao, X., Lin, F., Zhai, D., Kitada, S., Luciano, F., O'Donnell, E., Cao, Y., He, F., Lin, J., Reed, J. C., Satterthwait, A. C. et Zhang, X. (2008). A short Nur77-derived peptide converts Bcl-2 from a protector to a killer. *Cancer cell*, 14, 285-98.
- Komata, T., Kanzawa, T., Takeuchi, H., Germano, I. M., Schreiber, M., Kondo, Y. et Kondo, S. (2003). Antitumour effect of cyclin-dependent kinase inhibitors (p16(INK4A), p18(INK4C), p19(INK4D), p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1)) on malignant glioma cells. *British journal of cancer*, 88, 1277-80.
- Kondo, T. et Raff, M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science*, 289, 1754-7.
- Koonin, E. V. et Aravind, L. (2002). Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell death and differentiation*, 9, 394-404.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J. et Phinney, D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10711-6.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J. et Williams, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278, 294-8.
- Kothari, S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S. J., Bailes, M., Ens, K., Kirshenbaum, L. A. et Gibson, S.B. (2003). BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene*, 22, 4734-44.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. et Reed, J.C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research*, 53, 4701-14.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H. et Kirchhoff, S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 21, 8247-54.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H. et Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*, 276, 20633-40.
- Kudriashov, I. E., Iakovlev, A. A., Kudriashova, I. V. et Guliaeva, N.V. (2003). [Caspase-3 inhibition blocks long-term potentiation in hippocampal slices]. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova*, 53, 537-40.
- Kunisato, A., Chiba, S., Nakagami-Yamaguchi, E., Kumano, K., Saito, T., Masuda, S., Yamaguchi, T., Osawa, M., Kageyama, R., Nakauchi, H., Nishikawa, M. et Hirai, H. (2003). HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood*, 101, 1777-83.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R. et Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular cell*, 17, 525-35.
- LaBarge, M. A. et Blau, H.M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 111, 589-601.
- Laird, D. J., von Andrian, U. H. et Wagers, A.J. (2008). Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*, 132, 612-30.
- Lalier, L., Cartron, P., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B. et Vallette, F.M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 12, 887-96.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X. et Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell death and differentiation*, 9, 358-61.
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Vanden Berghe, T. et Vandenabeele, P. (2006). Caspases leave the beaten track: caspase-mediated activation of NF-kappaB. *The Journal of cell biology*, 173, 165-71.
- Land, S. C. et Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *The Journal of biological chemistry*, 282, 20534-43.
- Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredschneider, M. et Thumm, M. (2000). Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9. *Journal of bacteriology*, 182, 2125-33.

- Larghero, J., Vija, L., Lecourt, S., Michel, L., Verrecchia, F. et Farge, D. (2009). [Mesenchymal stem cells and immunomodulation: toward new immunosuppressive strategies for the treatment of autoimmune diseases?]. *La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne*, 30, 287-99.
- Larsen, K. E. et Sulzer, D. (2002). Autophagy in neurons: a review. *Histology and histopathology*, 17, 897-908.
- Lavin, M. F. et Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6, 931-42.
- Lee, J. et Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308, 551-4.
- Lemasters, J. J., Qian, T., He, L., Kim, J., Elmore, S. P., Cascio, W. E. et Brenner, D.A. (2002). Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxidants & redox signaling*, 4, 769-81.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S. et Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell*, 2, 183-92.
- Levine, B. et Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6, 463-77.
- Levine, B. et Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict?. *The Journal of clinical investigation*, 115, 2679-88.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature reviews. Genetics*, 3, 662-73.
- Li, H., Fan, X. et Houghton, J. (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 101, 805-15.
- Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C. et Zhang, X. (2000). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science*, 289, 1159-64.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. et Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94, 491-501.
- Li, J., Law, H. K. W., Lau, Y. L. et Chan, G.C.F. (2004). Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *British journal of haematology*, 127, 326-34.
- Li, L. Y., Luo, X. et Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-9.
- Li, L. et Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 605-31.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. et Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-89.
- Li, S. S., Liu, Y., Tseng, C., Chung, T., Lee, T. et Singh, S. (2006). Characterization and gene expression profiling of five new human embryonic stem cell lines derived in Taiwan. *Stem cells and development*, 15, 532-55.
- Li, S., Zhao, Y., He, X., Kim, T., Kuharsky, D. K., Rabinowich, H., Chen, J., Du, C. et Yin, X. (2002). Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 277, 26912-20.
- Liang, L. et Bickenbach, J.R. (2002). Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem cells*, 20, 21-31.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. et Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672-6.
- Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B. et Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology*, 72, 8586-96.
- Lilla, J., Stickens, D. et Werb, Z. (2002). Metalloproteases and adipogenesis: a weighty subject. *The American journal of pathology*, 160, 1551-4.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C. et Zhang, X. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, 116, 527-40.
- Lin, F. et Igarashi, P. (2003). Searching for stem/progenitor cells in the adult mouse kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14, 3290-2.
- Lin, H. (2002). The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nature reviews. Genetics*, 3, 931-40.

- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S. J., Murphy, M. E., Appella, E. et Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature cell biology*, 7, 165-71.
- Liston, P., Fong, W. G. et Korneluk, R.G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*, 22, 8568-80.
- Liu, C., Lee, C., Hong, C. et Wei, Y. (2004). Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1011, 133-45.
- Liu, J. P. (1999). Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13, 2091-104.
- Liu, J., Beqaj, S., Yang, Y., Honoré, B. et Schuger, L. (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-H plays a suppressive role in visceral myogenesis. *Mechanisms of development*, 104, 79-87.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. et Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-57.
- Liu, Y. H., Tang, Z., Kundu, R. K., Wu, L., Luo, W., Zhu, D., Sangiorgi, F., Snead, M. L. et Maxson, R.E. (1999). Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Developmental biology*, 205, 260-74.
- Lockshin, R. A. et Zakeri, Z. (2002). Caspase-independent cell deaths. *Current opinion in cell biology*, 14, 727-33.
- Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J. et Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell death and differentiation*, 6, 516-24.
- Luciano, F., Krajewska, M., Ortiz-Rubio, P., Krajewski, S., Zhai, D., Faustin, B., Bruey, J., Bailly-Maitre, B., Lichtenstein, A., Kolluri, S. K., Satterthwait, A. C., Zhang, X. et Reed, J.C. (2007). Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma. *Blood*, 109, 3849-55.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. et Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120, 237-48.
- Lüthi, A. U. et Martin, S.J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell death and differentiation*, 14, 641-50.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S. et Fröhlich, K.U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular cell*, 9, 911-7.
- Mahrus, S., Trinidad, J. C., Barkan, D. T., Sali, A., Burlingame, A. L. et Wells, J.A. (2008). Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell*, 134, 866-76.
- Maiuri, M. C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J. M., Tajeddine, N., Hickman, J. A., Geneste, O. et Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy*, 3, 374-6.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O. et Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal*, 26, 2527-39.
- Majumdar, M. K., Wang, E. et Morris, E.A. (2001). BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *Journal of cellular physiology*, 189, 275-84.
- Mann, S. S. et Hammarback, J.A. (1994). Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *The Journal of biological chemistry*, 269, 11492-7.
- Mariño, G. et López-Otín, C. (2004). Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61, 1439-54.
- Mariño, G., Uría, J. A., Puente, X. S., Quesada, V., Bordallo, J. et López-Otín, C. (2003). Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 278, 3671-8.
- Martin, A. P., Park, M. A., Mitchell, C., Walker, T., Rahmani, M., Thorburn, A., Häussinger, D., Reinehr, R., Grant, S. et Dent, P. (2009). BCL-2 family inhibitors enhance histone deacetylase inhibitor and sorafenib lethality via autophagy and overcome blockade of the extrinsic pathway to facilitate killing. *Molecular pharmacology*, 76, 327-41.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7634-8.
- Martinon, F., Burns, K. et Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*, 10, 417-26.

- Martinou, J. C., Desagher, S. et Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nature cell biology*, 2, E41-3.
- Masuyama, N., Oishi, K., Mori, Y., Ueno, T., Takahama, Y. et Gotoh, Y. (2001). Akt inhibits the orphan nuclear receptor Nur77 and T-cell apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 276, 32799-805.
- Mateo, V., Lagneaux, L., Bron, D., Biron, G., Armant, M., Delespesse, G. et Sarfati, M. (1999). CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nature medicine*, 5, 1277-84.
- Mathiasen, I. S., Lademann, U. et Jäättelä, M. (1999). Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer research*, 59, 4848-56.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. et Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192, 245-50.
- McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S. et Evan, G.I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *The Journal of cell biology*, 136, 215-27.
- Meier, P., Finch, A. et Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*, 407, 796-801.
- Meijer, A. J. et Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36, 2445-62.
- Meijer, A. J. et Dubbelhuis, P.F. (2004). Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 313, 397-403.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. et McKercher, S.R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 290, 1779-82.
- Michels, J., Johnson, P. W. M. et Packham, G. (2005). Mcl-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37, 267-71.
- Milne, C. D., Fleming, H. E., Zhang, Y. et Paige, C.J. (2004). Mechanisms of selection mediated by interleukin-7, the preBCR, and hemokinin-1 during B-cell development. *Immunological reviews*, 197, 75-88.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. et Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113, 631-42.
- Miura, M., Chen, X., Allen, M. R., Bi, Y., Gronthos, S., Seo, B., Lakhani, S., Flavell, R. A., Feng, X., Robey, P. G., Young, M. et Shi, S. (2004). A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation*, 114, 1704-13.
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2, 1535-41.
- Mizushima, N., Noda, T. et Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *The EMBO journal*, 18, 3888-96.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. et Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-8.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y. et Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function*, 27, 421-9.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y. et Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology*, 152, 657-68.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. et Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell*, 15, 1101-11.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. et Ohsumi, Y. (2003). Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 35, 553-61.
- Mogi, M. et Togari, A. (2003). Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 278, 47477-82.
- Moll, U. M., Marchenko, N. et Zhang, X. (2006). p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*, 25, 4725-43.
- Montesinos, J. J., Flores-Figueroa, E., Castillo-Medina, S., Flores-Guzmán, P., Hernández-Estévez, E., Fajardo-Orduña, G., Orozco, S. et Mayani, H. (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*, 11, 163-76.
- Morioka, K., Toné, S., Mukaida, M. et Takano-Ohmuro, H. (1998). The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of erythroid cells. *Experimental cell research*, 240, 206-17.

- Morrison, S. J., Wright, D. E. et Weissman, I.L. (1997). Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1908-13.
- Mueller, L. P., Luetzkendorf, J., Mueller, T., Reichelt, K., Simon, H. et Schmoll, H. (2006). Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem cells*, 24, 2753-65.
- Mukerjee, N., McGinnis, K. M., Park, Y. H., Gnegy, M. E. et Wang, K.K. (2000). Caspase-mediated proteolytic activation of calcineurin in thapsigargin-mediated apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 379, 337-43.
- Mund, T., Gewies, A., Schoenfeld, N., Bauer, M. K. A. et Grimm, S. (2003). Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17, 696-8.
- Murdoch, B., Chadwick, K., Martin, M., Shojaei, F., Shah, K. V., Gallacher, L., Moon, R. T. et Bhatia, M. (2003). Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3422-7.
- Murray, E. J., Grisanti, M. S., Bentley, G. V. et Murray, S.S. (1997b). E64d, a membrane-permeable cysteine protease inhibitor, attenuates the effects of parathyroid hormone on osteoblasts in vitro. *Metabolism: clinical and experimental*, 46, 1090-4.
- Murray, S. S., Grisanti, M. S., Bentley, G. V., Kahn, A. J., Urist, M. R. et Murray, E.J. (1997a). The calpain-calpastatin system and cellular proliferation and differentiation in rodent osteoblastic cells. *Experimental cell research*, 233, 297-309.
- Nadiri, A., Wolinski, M. K. et Saleh, M. (2006). The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177, 4239-45.
- Nagata, S. et Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-56.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. et Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. et de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17-29.
- Nemoto, T., Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Minematsu-Ikeguchi, N., Yokota, M., Ohsumi, M., Ueno, T. et Kominami, E. (2003). The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *The Journal of biological chemistry*, 278, 39517-26.
- Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J. et Shore, G.C. (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *The Journal of biological chemistry*, 268, 25265-8.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. et Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379-91.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, 6, 1028-42.
- Niemann, A., Baltés, J. et Elsässer, H.P. (2001). Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 49, 177-85.
- Nilsson, S. K., Johnston, H. M., Whitty, G. A., Williams, B., Webb, R. J., Denhardt, D. T., Bertonecello, I., Bendall, L. J., Simmons, P. J. et Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106, 1232-9.
- Nishino, I. (2003). Autophagic vacuolar myopathies. *Current neurology and neuroscience reports*, 3, 64-9.
- Nobta, M., Tsukazaki, T., Shibata, Y., Xin, C., Moriishi, T., Sakano, S., Shindo, H. et Yamaguchi, A. (2005). Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *The Journal of biological chemistry*, 280, 15842-8.
- Noda, K., Miyoshi, E., Nakahara, S., Ihara, H., Gao, C. X., Honke, K., Yanagidani, S., Sasaki, Y., Kasahara, A., Hori, M., Hayashi, N. et Taniguchi, N. (2002). An enzymatic method of analysis for GDP-L-fucose in biological samples, involving high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 310, 100-6.
- Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y. et Klionsky, D.J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *The Journal of cell biology*, 148, 465-80.

- Obara, K., Sekito, T., Niimi, K. et Ohsumi, Y. (2008). The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *The Journal of biological chemistry*, 283, 23972-80.
- Oberstein, A., Jeffrey, P. D. et Shi, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *The Journal of biological chemistry*, 282, 13123-32.
- Odelberg, S. J., Kollhoff, A. et Keating, M.T. (2000). Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell*, 103, 1099-109.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F. et Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology*, 26, 9220-31.
- Ogier-Denis, E. et Codogno, P. (2003). Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1603, 113-28.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 211-6.
- Okazaki, N., Yan, J., Yuasa, S., Ueno, T., Kominami, E., Masuho, Y., Koga, H. et Muramatsu, M. (2000). Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain research. Molecular brain research*, 85, 1-12.
- Okita, K., Ichisaka, T. et Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448, 313-7.
- Okuyama, R., Nguyen, B., Talora, C., Ogawa, E., Tommasi di Vignano, A., Lioumi, M., Chiorino, G., Tagami, H., Woo, M. et Dotto, G.P. (2004). High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Developmental cell*, 6, 551-62.
- Olson, N. E., Graves, J. D., Shu, G. L., Ryan, E. J. et Clark, E.A. (2003). Caspase activity is required for stimulated B lymphocytes to enter the cell cycle. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170, 6065-72.
- Oomman, S., Finckbone, V., Dertien, J., Attridge, J., Henne, W., Medina, M., Mansouri, B., Singh, H., Strahlendorf, H. et Strahlendorf, J. (2004). Active caspase-3 expression during postnatal development of rat cerebellum is not systematically or consistently associated with apoptosis. *The Journal of comparative neurology*, 476, 154-73.
- Oomman, S., Strahlendorf, H., Dertien, J. et Strahlendorf, J. (2006). Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation. *Brain research*, 1078, 19-34.
- Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. et Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 1259-63.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R. et Kessin, R.H. (2003). Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of biological chemistry*, 278, 17636-45.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R. et Kessin, R.H. (2004). *Dictyostelium* macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *The Journal of biological chemistry*, 279, 15621-9.
- Palaga, T. et Osborne, B. (2002). The 3D's of apoptosis: death, degradation and DIAPs. *Nature cell biology*, 4, E149-51.
- Pan, G. J., Chang, Z. Y., Schöler, H. R. et Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell research*, 12, 321-9.
- Pan, G., Qin, B., Liu, N., Schöler, H. R. et Pei, D. (2004). Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. *The Journal of biological chemistry*, 279, 37013-20.
- Park, J. A., Kim, K. W., Kim, S. I. et Lee, S.K. (1998). Caspase 3 specifically cleaves p21WAF1/CIP1 in the earlier stage of apoptosis in SK-HEP-1 human hepatoma cells. *European journal of biochemistry / FEBS*, 257, 242-8.
- Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J., Sackstein, R. et Down, J.D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5431-6.
- Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M. et Codogno, P. (2008). Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*, 90, 313-23.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. et Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122, 927-39.

- Peller, S., Frenkel, J., Lapidot, T., Kahn, J., Rahimi-Levene, N., Yona, R., Nissim, L., Goldfinger, N., Sherman, D. J. et Rotter, V. (2003). The onset of p53-dependent apoptosis plays a role in terminal differentiation of human normoblasts. *Oncogene*, 22, 4648-55.
- Pelletier, M., Oliver, L., Meflah, K. et Vallette, F.M. (2005). Caspase-3 can be pseudo-activated by a Ca²⁺-dependent proteolysis at a non-canonical site. *FEBS letters*, 579, 2364-8.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. et Goff, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284, 1168-70.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J. et Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry*, 275, 992-8.
- Pinto, D. et Clevers, H. (2005). Wnt, stem cells and cancer in the intestine. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 97, 185-96.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. et Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- Poommipanit, P. B., Chen, B. et Oltvai, Z.N. (1999). Interleukin-3 induces the phosphorylation of a distinct fraction of bcl-2. *The Journal of biological chemistry*, 274, 1033-9.
- Potier, E., Ferreira, E., Andriamanalijaona, R., Pujol, J., Oudina, K., Logeart-Avramoglou, D. et Petite, H. (2007). Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone*, 40, 1078-87.
- Pouysségur, J., Dayan, F. et Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441, 437-43.
- Prasad, S., Soldatenkov, V. A., Srinivasarao, G. et Dritschilo, A. (1998). Identification of keratins 18, 19 and heat-shock protein 90 beta as candidate substrates of proteolysis during ionizing radiation-induced apoptosis of estrogen-receptor negative breast tumor cells. *International journal of oncology*, 13, 757-64.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F. M., di Rago, J. et Martinou, J. (2005). Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell death and differentiation*, 12, 1613-21.
- Pyo, J., Jang, M., Kwon, Y., Lee, H., Jun, J., Woo, H., Cho, D., Choi, B., Lee, H., Kim, J., Mizushima, N., Oshumi, Y. et Jung, Y. (2005). Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *The Journal of biological chemistry*, 280, 20722-9.
- Rasmusson, I. (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental cell research*, 312, 2169-79.
- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., Koop, B. F., Peterson, E. P., Thornberry, N. A., Huang, J., MacPherson, D. P., Black, S. C., Hornung, F., Lenardo, M. J., Hayden, M. R., Roy, S. et Nicholson, D.W. (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell death and differentiation*, 5, 271-88.
- Ravagnan, L., Roumier, T. et Kroemer, G. (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *Journal of cellular physiology*, 192, 131-7.
- Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J. H., Reed, J. C., Gietz, R. D. et Greenberg, A.H. (2000). BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *The Journal of biological chemistry*, 275, 1439-48.
- Reggiori, F. et Klionsky, D.J. (2005). Autophagosomes: biogenesis from scratch?. *Current opinion in cell biology*, 17, 415-22.
- Reik, W., Dean, W. et Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-93.
- Renault, V., Piron-Hamelin, G., Forestier, C., DiDonna, S., Decary, S., Hentati, F., Saillant, G., Butler-Browne, G. S. et Mouly, V. (2000). Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Experimental gerontology*, 35, 711-9.
- Rendl, M., Ban, J., Mrass, P., Mayer, C., Lengauer, B., Eckhart, L., Declerq, W. et Tschachler, E. (2002). Caspase-14 expression by epidermal keratinocytes is regulated by retinoids in a differentiation-associated manner. *The Journal of investigative dermatology*, 119, 1150-5.

- Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L. et Donovan, P.J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359, 550-1.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. et Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423, 409-14.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H. et Verfaillie, C.M. (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *The Journal of clinical investigation*, 109, 337-46.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L. et Verfaillie, C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98, 2615-25.
- Ribeil, J. A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Dussiot, M., Kersual, J. et Hermine, O. (2005). [Erythropoiesis: a paradigm for the role of caspases in cell death and differentiation]. *Journal de la Societe de biologie*, 199, 219-31.
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M. et Goldfarb, D.S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 14, 129-41.
- Robin, C., Pflumio, F., Vainchenker, W. et Coulombel, L. (1999). Identification of lymphomyeloid primitive progenitor cells in fresh human cord blood and in the marrow of nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice transplanted with human CD34(+) cord blood cells. *The Journal of experimental medicine*, 189, 1601-10.
- Robins, J. C., Akeno, N., Mukherjee, A., Dalal, R. R., Aronow, B. J., Koopman, P. et Clemens, T.L. (2005). Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone*, 37, 313-22.
- Rochat, A., Kobayashi, K. et Barrandon, Y. (1994). Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell*, 76, 1063-73.
- Rohn, T. T., Cusack, S. M., Kessinger, S. R. et Oxford, J.T. (2004). Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells. *Experimental cell research*, 295, 215-25.
- Rosen, E. D. et MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 885-96.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. et Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development*, 14, 1293-307.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvessen, G. S. et Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO journal*, 16, 6914-25.
- Ruvolo, P. P., Deng, X., Carr, B. K. et May, W.S. (1998). A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 273, 25436-42.
- Ryoo, H. M., Hoffmann, H. M., Beumer, T., Frenkel, B., Towler, D. A., Stein, G. S., Stein, J. L., van Wijnen, A. J. et Lian, J.B. (1997). Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11, 1681-94.
- Ryoo, H., Lee, M. et Kim, Y. (2006). Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, 366, 51-7.
- Réb , C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Pr votat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., Fontenay, M. et Solary, E. (2007). Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood*, 109, 1442-50.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. et Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-74.
- Saleh, M., Vaillancourt, J. P., Graham, R. K., Huyck, M., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Steinberg, M. H., Nolan, V., Baldwin, C. T., Hotchkiss, R. S., Buchman, T. G., Zehnauer, B. A., Hayden, M. R., Farrer, L. A., Roy, S. et Nicholson, D.W. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature*, 429, 75-9.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P. Y. B., Berry, D. M., Tamblin, L., Shehabeldin, A., Migon, E., Wakeham, A., Bouchard, D., Yeh, W. C., McGlade, J. C., Ohashi, P. S. et Hakem, R. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes & development*, 17, 883-95.
- Salvesen, G. S. et Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10964-7.
- Sanders, E. J. et Parker, E. (2003). Retroviral overexpression of bcl-2 in the embryonic chick lens influences denucleation in differentiating lens fiber cells. *Differentiation; research in biological diversity*, 71, 425-33.
- Sato, H., Kuwashima, N., Sakaida, T., Hatano, M., Dusak, J. E., Fellows-Mayle, W. K., Papworth, G. D., Watkins, S. C., Gambotto, A., Pollack, I. F. et Okada, H. (2005). Epidermal growth factor receptor-

- transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors. *Cancer gene therapy*, *12*, 757-68.
- Satoh, Y., Matsumura, I., Tanaka, H., Ezoe, S., Sugahara, H., Mizuki, M., Shibayama, H., Ishiko, E., Ishiko, J., Nakajima, K. et Kanakura, Y. (2004). Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *The Journal of biological chemistry*, *279*, 24986-93.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. et Fesik, S.W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, *275*, 983-6.
- Schipani, E., Ryan, H. E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M. et Johnson, R.S. (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & development*, *15*, 2865-76.
- Schmidt, E. V. (1999). The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*, *18*, 2988-96.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, *4*, 7-25.
- Sciaudone, M., Gazzo, E., Priest, L., Delany, A. M. et Canalis, E. (2003). Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology*, *144*, 5631-9.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. et Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, *102*, 777-86.
- Sherr, C. J. et DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?. *Cell*, *102*, 407-10.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, *9*, 459-70.
- Shi, Y. et Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, *113*, 685-700.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. et Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology*, *6*, 1221-8.
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T. et Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *The EMBO journal*, *18*, 5234-41.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R. et Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular cell*, *11*, 519-27.
- Shirakabe, K., Terasawa, K., Miyama, K., Shibuya, H. et Nishida, E. (2001). Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, *6*, 851-6.
- Shiras, A., Chettiar, S. T., Shepal, V., Rajendran, G., Prasad, G. R. et Shastry, P. (2007). Spontaneous transformation of human adult nontumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by genomic instability in a human model of glioblastoma. *Stem cells*, *25*, 1478-89.
- Shirasawa, S., Sekiya, I., Sakaguchi, Y., Yagishita, K., Ichinose, S. et Muneta, T. (2006). In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *Journal of cellular biochemistry*, *97*, 84-97.
- Shu, H. B., Halpin, D. R. et Goeddel, D.V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity*, *6*, 751-63.
- Silva, J. et Smith, A. (2008). Capturing pluripotency. *Cell*, *132*, 532-6.
- Simonian, P. L., Grillot, D. A., Andrews, D. W., Leber, B. et Nuñez, G. (1996). Bax homodimerization is not required for Bax to accelerate chemotherapy-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*, *271*, 32073-7.
- Simonian, P. L., Grillot, D. A., Merino, R. et Nuñez, G. (1996). Bax can antagonize Bcl-XL during etoposide and cisplatin-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL. *The Journal of biological chemistry*, *271*, 22764-72.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. et Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, *63*, 5821-8.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. et Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, *432*, 396-401.
- Slagsvold, H. H., Østfold, A., Fallgren, A. B. et Paulsen, R.E. (2002). Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2. *Biochemical and biophysical research communications*, *291*, 1146-50.
- Smith, A. G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology*, *17*, 435-62.

- Song, X. et Xie, T. (2002). DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the *Drosophila* ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, 14813-8.
- Song, X., Zhu, C., Doan, C. et Xie, T. (2002). Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science*, *296*, 1855-7.
- Sordet, O., Rébé, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E. et Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*, *100*, 4446-53.
- Sorenson, C. M. et Sheibani, N. (2002). Sustained activation of MAPK/ERKs signaling pathway in cystic kidneys from *bcl-2* ^{-/-} mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, *283*, F1085-90.
- Squier, M. K., Miller, A. C., Malkinson, A. M. et Cohen, J.J. (1994). Calpain activation in apoptosis. *Journal of cellular physiology*, *159*, 229-37.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., MacFarlane, M., Luo, Z., Huang, Z., Fernandes-Alnemri, T. et Alnemri, E.S. (1998). Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *The Journal of biological chemistry*, *273*, 10107-11.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. et Alnemri, E.S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, *410*, 112-6.
- Srinivasula, S. M., Poyet, J., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z. et Alnemri, E.S. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *The Journal of biological chemistry*, *277*, 21119-22.
- Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E. J. et Yancopoulos, G.D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, *267*, 1349-53.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M. et Salvesen, G.S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *The Journal of biological chemistry*, *274*, 8359-62.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N. et Scadden, D.T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*, *99*, 2369-78.
- Strange, R., Metcalfe, T., Thackray, L. et Dang, M. (2001). Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microscopy research and technique*, *52*, 171-81.
- Strasser, A., O'Connor, L. et Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry*, *69*, 217-45.
- Studený, M., Marini, F. C., Dembinski, J. L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B. N., Champlin, R. E. et Andreeff, M. (2004). Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute*, *96*, 1593-603.
- Su, H., Bidère, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J., Salmena, L., Hakem, R., Straus, S. et Lenardo, M. (2005). Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science*, *307*, 1465-8.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. et Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, *25*, 977-88.
- Sun, P., Gao, J., Liu, Y., Wei, L., Wu, L. et Liu, Z. (2008). RNA interference (RNAi)-mediated vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) reduction interferes with lymphangiogenesis and enhances epirubicin sensitivity of breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, *308*, 161-8.
- Sun, S. et Ravid, K. (1999). Role of a serine/threonine kinase, Mst1, in megakaryocyte differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, *76*, 44-60.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Abersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. et Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, *397*, 441-6.
- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A. et Trapani, J.A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *The Journal of experimental medicine*, *192*, 1403-14.
- Suzuki, A., Ghayor, C., Guicheux, J., Magne, D., Quillard, S., Kakita, A., Ono, Y., Miura, Y., Oiso, Y., Itoh, M. et Caverzasio, J. (2006). Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *21*, 674-83.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. et Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Molecular cell*, *8*, 613-21.

- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C. et Takahashi, R. (2001). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *The Journal of biological chemistry*, 276, 27058-63.
- Takahashi, K. et Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. et Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- Tanaka, T., Kurose, A., Huang, X., Dai, W. et Darzynkiewicz, Z. (2006). ATM activation and histone H2AX phosphorylation as indicators of DNA damage by DNA topoisomerase I inhibitor topotecan and during apoptosis. *Cell proliferation*, 39, 49-60.
- Tanida, I., Ueno, T. et Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36, 2503-18.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H. et Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74, 845-53.
- Tezuka, K., Yasuda, M., Watanabe, N., Morimura, N., Kuroda, K., Miyatani, S. et Hozumi, N. (2002). Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17, 231-9.
- Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M. et Krause, D.S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 31, 235-40.
- Thiede, B., Dimmler, C., Siejak, F. et Rudel, T. (2001). Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis. *The Journal of biological chemistry*, 276, 26044-50.
- Thiede, B., Treumann, A., Kretschmer, A., Söhlke, J. et Rudel, T. (2005). Shotgun proteome analysis of protein cleavage in apoptotic cells. *Proteomics*, 5, 2123-30.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schröter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E. et Tschopp, J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 386, 517-21.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. et Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J. et et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356, 768-74.
- Till, J. E. et McCulloch, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 14, 213-22.
- Timmer, J. C. et Salvesen, G.S. (2007). Caspase substrates. *Cell death and differentiation*, 14, 66-72.
- Trowbridge, J. J., Xenocostas, A., Moon, R. T. et Bhatia, M. (2006). Glycogen synthase kinase-3 is an in vivo regulator of hematopoietic stem cell repopulation. *Nature medicine*, 12, 89-98.
- Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., Wang, M. L., Alexander, P. G., Haleem-Smith, H., Hozack, W. J., Manner, P. A., Danielson, K. G. et Tuan, R.S. (2003). Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem cells*, 21, 681-93.
- Tulina, N. et Matunis, E. (2001). Control of stem cell self-renewal in Drosophila spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science*, 294, 2546-9.
- Turnpenny, L., Brickwood, S., Spalluto, C. M., Piper, K., Cameron, I. T., Wilson, D. I. et Hanley, N.A. (2003). Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells. *Stem cells*, 21, 598-609.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H. et Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 14720-5.
- Ueno, T., Ishidoh, K., Mineki, R., Tanida, I., Murayama, K., Kadowaki, M. et Kominami, E. (1999). Autolysosomal membrane-associated betaine homocysteine methyltransferase. Limited degradation fragment of a sequestered cytosolic enzyme monitoring autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 274, 15222-9.
- Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V. et Dixit, V.M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell*, 6, 961-7.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L. et Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO journal*, 22, 5612-21.
- Valentin, M. et Yang, E. (2008). Autophagy is activated, but is not required for the G0 function of BCL-2 or BCL-xL. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7, 2762-8.

- Vandekerckhove, J., Ribeil, J., Zermati, Y., Garrido, C., Courtois, G., Solary, E. et Hermine, O. (2008). [Hsp 70, guardian angel of GATA-1 during erythroid differentiation]. *Medecine sciences : M/S*, 24, 37-40.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W. S. et Bernstein, I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature medicine*, 6, 1278-81.
- Vaux, D. L. et Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell*, 96, 245-54.
- Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J. et Südhof, T.C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, 287, 864-9.
- Vertino, P. M., Yen, R. W., Gao, J. et Baylin, S.B. (1996). De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Molecular and cellular biology*, 16, 4555-65.
- Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J. et Noël, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in biotechnology*, 27, 307-14.
- Van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X. et Vandenamee, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 304, 487-97.
- Van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R. et Vandenamee, P. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell death and differentiation*, 8, 1136-42.
- Van Osch, G. J. V. M., Mandl, E. W., Marijnissen, W. J. C. M., van der Veen, S. W., Verwoerd-Verhoef, H. L. et Verhaar, J.A.N. (2002). Growth factors in cartilage tissue engineering. *Biorheology*, 39, 215-20.
- Wagers, A. J. et Weissman, I.L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116, 639-48.
- Wagers, A. J., Allsopp, R. C. et Weissman, I.L. (2002). Changes in integrin expression are associated with altered homing properties of Lin(-/lo)Thy1.1(lo)Sca-1(+)-kit(+) hematopoietic stem cells following mobilization by cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor. *Experimental hematology*, 30, 176-85.
- Wakelam, M. J. (1985). The fusion of myoblasts. *The Biochemical journal*, 228, 1-12.
- Walker, M. R., Patel, K. K. et Stappenbeck, T.S. (2009). The stem cell niche. *The Journal of pathology*, 217, 169-80.
- Wang, D. W., Fermor, B., Gimble, J. M., Awad, H. A. et Guilak, F. (2005). Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *Journal of cellular physiology*, 204, 184-91.
- Wang, G. Q., Wieckowski, E., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X. M. et Rabinowich, H. (2001). Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *The Journal of experimental medicine*, 194, 1325-37.
- Wang, J., Sakariassen, P. Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S. O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røsland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R. et Enger, P.Ø. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 122, 761-8.
- Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T., Milliman, C. L. et Korsmeyer, S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & development*, 10, 2859-69.
- Wang, S., Miura, M., Jung, Y. K., Zhu, H., Li, E. et Yuan, J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell*, 92, 501-9.
- Watanabe, Y. et Akaike, T. (1999). Possible involvement of caspase-like family in maintenance of cytoskeleton integrity. *Journal of cellular physiology*, 179, 45-51.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. et Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292, 727-30.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M. et Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell*, 30, 678-88.
- Weil, M., Raff, M. C. et Braga, V.M. (1999). Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Current biology : CB*, 9, 361-4.
- Wen, X., Miyake, S., Akiyama, Y. et Yuasa, Y. (2004). BMP-2 modulates the proliferation and differentiation of normal and cancerous gastric cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 316, 100-6.
- Widlak, P., Li, L. Y., Wang, X. et Garrard, W.T. (2001). Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *The Journal of biological chemistry*, 276, 48404-9.

- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M. et 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 & development*, *19*, 1294-305.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. et Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology*, *139*, 1281-92.
- Wong, G. A., Tang, V., El-Sabeawy, F. et Weiss, R.H. (2003). BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, *284*, E972-9.
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. et Black, I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*, *61*, 364-70.
- Wride, M. A., Parker, E. et Sanders, E.J. (1999). Members of the bcl-2 and caspase families regulate nuclear degeneration during chick lens fibre differentiation. *Developmental biology*, *213*, 142-56.
- Xiang, J., Chao, D. T. et Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*, 14559-63.
- Xie, T. et Spradling, A.C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary. *Science*, *290*, 328-30.
- Yamaguchi, A., Ishizuya, T., Kintou, N., Wada, Y., Katagiri, T., Wozney, J. M., Rosen, V. et Yoshiki, S. (1996). Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochemical and biophysical research communications*, *220*, 366-71.
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *1*, 39-49.
- Yamashita, Y. M., Jones, D. L. et Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science*, *301*, 1547-50.
- Yan, X. X., Najbauer, J., Woo, C. C., Dashtipour, K., Ribak, C. E. et Leon, M. (2001). Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *The Journal of comparative neurology*, *433*, 4-22.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. et Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, *275*, 1129-32.
- Yang, Y. L. et Li, X.M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell research*, *10*, 169-77.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G. et Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nature structural biology*, *9*, 680-4.
- Yilmaz, O. H. et Morrison, S.J. (2008). The PI-3kinase pathway in hematopoietic stem cells and leukemia-initiating cells: a mechanistic difference between normal and cancer stem cells. *Blood cells, molecules & diseases*, *41*, 73-6.
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N. et Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, *369*, 321-3.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. et Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, *115*, 281-92.
- Yorimitsu, T. et Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*, *12 Suppl 2*, 1542-52.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Miyazaki, H., Takahashi, T. et Suda, T. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, *1*, 685-97.
- Youle, R. J. et Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *9*, 47-59.
- Young, H. E., Steele, T. A., Bray, R. A., Hudson, J., Floyd, J. A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., Duenzl, M., Lucas, P. A. et Black, A.C.J. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical record*, *264*, 51-62.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T. et Simon, H. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature cell biology*, *8*, 1124-32.
- Yousfi, M., Lasmoles, F., Lomri, A., Delannoy, P. et Marie, P.J. (2001). Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *The Journal of clinical investigation*, *107*, 1153-61.

- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. et Thomson, J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, *318*, 1917-20.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. et Lenardo, M.J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, *304*, 1500-2.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. et Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes & development*, *9*, 2635-45.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. et Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 15077-82.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R. et Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO reports*, *10*, 285-92.
- Zeng, X., Overmeyer, J. H. et Maltese, W.A. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *Journal of cell science*, *119*, 259-70.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E. et Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *The Journal of experimental medicine*, *193*, 247-54.
- Zermati, Y., Mouhamad, S., Stergiou, L., Besse, B., Galluzzi, L., Bohrer, S., Pauleau, A., Rosselli, F., D'Amelio, M., Amendola, R., Castedo, M., Hengartner, M., Soria, J., Cecconi, F. et Kroemer, G. (2007). Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint. *Molecular cell*, *28*, 624-37.
- Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G. et Korsmeyer, S.J. (1997). BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *The Journal of biological chemistry*, *272*, 24101-4.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y. et Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, *425*, 836-41.
- Zhang, Y., Fujita, N. et Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*, *18*, 1131-8.
- Zhang, Y., Padalecki, S. S., Chaudhuri, A. R., De Waal, E., Goins, B. A., Grubbs, B., Ikeno, Y., Richardson, A., Mundy, G. R. et Herman, B. (2007). Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. *Mechanisms of ageing and development*, *128*, 213-21.
- Zhao, C., Blum, J., Chen, A., Kwon, H. Y., Jung, S. H., Cook, J. M., Lagoo, A. et Reya, T. (2007). Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer cell*, *12*, 528-41.
- Zuzarte-Luís, V. et Hurlé, J.M. (2002). Programmed cell death in the developing limb. *The International journal of developmental biology*, *46*, 871-6.
- Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A. et Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis research*, *2*, 477-88.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : Article “Decreased autophagy and enhanced apoptosis
accompany the in vitro early differentiation of human bone marrow
mesenchymal stem cells”.**

(Manuscrit soumis à Stem cells)

Oliver L^{1, 2}, Hue E^{1, 2}, Rossignol J^{2, 3}, Bougras G^{1, 2}, Naveilhan P^{2, 3}, Heymann D^{2, 4},
Lescaudron L^{2, 3, 5}, Vallette FM^{1, 2*}.

1. INSERM, UMR 892, équipe labellisée « Ligue contre le Cancer », Nantes F44000 France
2. Université de Nantes, Faculté de Médecine, Université de Nantes
3. INSERM, UMR 643 INSERM, Nantes F44000 France
4. INSERM, UMR 957 INSERM, Nantes F44000 France
5. Service de Physiologie Animale et Humaine, UFR Sciences et Techniques, Université de Nantes.

* corresponding author

Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers

UMR 892 INSERM/Université de Nantes

8, Quai Moncousu BP 70721, 44007 CEDEX 01 Nantes France

Tel: 33-228080324

Fax: 33-228080329

e-mail: francois.vallette@inserm.fr

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Oliver L: collection and assembly of data, manuscript writing.

Hue E: collection and assembly of data.

Rossignol J: collection and assembly of data.

Bougras G: collection and assembly of data.

Naveilhan P: data analysis and interpretation.

Heymann D: provision of study material or patients.

Lescaudron L: data analysis and interpretation.

Vallette F: conception and design, financial support, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.

SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSCs) are fibroblast-like, non-hematopoietic multipotent cells derived from the bone marrow stroma and other tissues, which serve as precursors for various cell-types. Like other adult stem cells, MSCs can be maintained over extended periods of time before activation and differentiation. Little is known about the programs that sustain the survival of these cells. We show that undifferentiated MSCs did not undergo apoptosis in response to different cell death inducers. Conversely, the same inducers can readily induce apoptosis, in the early stages of differentiation. The resistance to apoptosis in undifferentiated human MSCs (hMSCs) is dependent upon the presence of Bcl-XI as the inhibition of the expression of this protein by shRNA renders these cells sensitive to apoptosis. We show that the switch between apopto-resistance to apopto-sensitivity is paralleled by an inhibition of the autophagic activity as undifferentiated but not differentiating cells exhibited a high basal autophagy. The pharmacological inhibition of autophagy significantly affected cell survival as its inhibition sensitizes the cells to the apoptotic cell death program. Thus, the process of differentiation of hMSCs is associated with an opposite modulation of apoptosis and autophagy. **(188 words)**

INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells or marrow stromal cells (MSCs) represent a potential therapeutic source, not only in cell replacement strategies, but also as vectors in various pathologies including cancer and neurodegenerative diseases (1-3). These cells continually renew themselves, while a portion become committed to mesenchymal cell lineages such as bone, cartilage, tendon, ligament, and muscle and possibly other cell types such as neurons, adipocyte (1-3). MSCs are also essential in providing support in the growth and differentiation of hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment (1-3). In addition, the transit of these cells through the peripheral blood system has been reported and thus they could participate in the repair of numerous tissues (4). The relative easiness of their isolation, characterization and control of their differentiation has made the MSCs a putative powerful tool in regenerative medicine. However, very little data are available on the fate of these cells *in vivo* (i.e. trans-differentiation, survival...) (5). One feature common to stem cells is their capacity to survive for long periods in homologous conditions but to die rapidly upon their transfer into another individual (1-3). These observations suggest that these cells, which are highly proliferative *in vitro*, also possess efficient cell death machinery. However, there is little information about the mechanism of survival of most adult stem/progenitor cells, although this question must be crucial in regard to their physiological role. It has been shown in fetal MSC that these cells exhibit functional apoptotic pathways (6). In agreement with the latter hypothesis, genetically modified MSCs with an anti-apoptotic Bcl-2 gene exhibited enhanced cell survival upon intracardiac engraftment (7). In other recent reports, it has been shown that MSCs can survive pro-apoptotic anti-cancer treatments (8, 9).

Macroautophagy (commonly referred to as autophagy) is the process by which intact organelles and/or large portions of the cytoplasm are engulfed within double-membrane autophagic vacuoles for degradation (10). Autophagy is an important

mechanism implicated in both cell death and survival that is instrumental in both embryonic and adult homeostasis (10) and has been shown to be essential for the long-term survival of neurons (11). However, no data have been reported, to our knowledge, on the functional role of autophagy and apoptosis in adult MSCs. In the present work, we have analyzed both apoptosis and autophagy in undifferentiated and during early differentiation of human MSCs (hMSCs) *in vitro*. We emphasized in our study on the involvement of these programs in the response to DNA damage as it has been shown to limit the function of hematopoietic stem cells (12, 13).

MATERIALS & METHODS

MATERIALS: Unless stated otherwise, all cell culture material was obtained from Gibco (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Unless stated otherwise, all chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The 14 bone marrow samples used in this study were obtained from healthy donors operated at the Dept of Orthopaedics at "Centre Hospitalier Universitaire de Nantes". The average age of patients was 41 ± 3 yrs (ranging from 25 to 56 yrs, 6 males and 8 females). BM samples were obtained according to the recommendations of the French national ethics committee. Human foreskins were obtained from the Dept of Paediatric at "Hôpital Mere et Enfant de Nantes".

METHODS

MSC Isolation and Cell Culture: The bone marrow cells were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll). The cells collected at the interface were cultured in alpha-MEM modified with ribonucleosides and deoxyribonucleosides supplemented with 20% fetal calf serum, with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (complete medium) in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity. MSC cultures were used between passage 0 and 10 passage. Cultures were kept at subconfluent levels (about 75% confluency) and passaged every 5-7 days. Human foreskin fibroblasts were isolated by mincing the foreskins prior to a treatment with trypsin. The fibroblasts recuperated were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity and used between passage 2 and passage 35.

Differentiation of MSCs: hMSCs differentiation (Osteogenic) was induced *in vitro* by culture in the NH OsteoDiff medium (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) for 21 days. Osteogenic differentiation was detected by determination of the expression of alkaline phosphatase using 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) substrate (Sigmafast B5655) according to the manufacturer's instructions. Adipocytes differentiation was induced *in vitro* by culturing the cells in NH AdipoDiff Medium (Miltenyi Biotec) for 21 days. Adipocyte differentiation was detected by coloration with Oil Red O, which colors hydrophobic lipids. Neural differentiation was induced in hMSCs by culturing the cells for 48h in complete medium containing 20 ng/ml human recombinant (hr) bFGF (100-18B, PeproTech, France) and 20 ng/ml hrEGF (100-15, PeproTech, France). The cells were then cultured in complete medium containing either 10 ng/ml hrBDNF (Sigma, B-3795) to induce differentiation along the neuronal pathway or 10 ng/ml hrPDGF-BB (P-3201, Sigma) to induce differentiation along the glial pathway.

Lentiviral infection: hMSCs were cultured with lentiviral particles (Sigma-Aldrich) at a multiplicity of infection of 15 in complete medium 48 h before analysis. The lentiviral particles used were for Bcl-XI: TRCN0000033499, TRCN0000033500, **TRCN0000033501**, **TRCN0000033502**, TRCN0000033503 (highlighted are those validated for our study). Atg7 knockdown was done using shRNA technology. ShAtg7 or a scrambled sequence was subcloned into the XbaI/XhoI sites of the pFG12 lentiviral vector.

FACSscan Analysis: The phenotype of hMSCs was monitored by flow cytometry. For phenotypic analysis, conjugated and non-conjugated antibodies were used (cf. suppl. table). For non-conjugated antibodies, the corresponding secondary antibody was used. Briefly, 2×10^5 cells were resuspended in complete medium for 30 min at 4°C. For intracellular staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized in PBS containing 0, 5 % saponin. The cells were incubated with the primary antibody for 30 min at 4°C in PBS, 0, 25% saponin and then, where necessary, the secondary antibody was added for 30 min at 4°C. Cells were washed twice in PBS before analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) using Cell Quest Pro software. The appropriate isotype controls were included and a minimum of 10 000 events were acquired for each condition. The debris was excluded from the analysis according to their FSC/SSC properties. BD ApoAlert™ APO 2.7-PE (BD Biosciences) was

used to determine the percentage of apoptotic cells according to the manufacturer's instructions.

RT and Q-PCR: Cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS) and total RNA isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) with DNase I treatment. After quantification of the RNA using the Nano Drop (Nano Drop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µg RNA was reverse transcribed using Reverse Transcriptase AffinityScript (Agilent-Stratagene, Massy, France) for cDNA synthesis. Quantitative real-time PCR assays were performed and monitored in triplicate using an MX4000 multiplex Quantitative PCR system (Agilent-Stratagene). The PCR reactions contained 40 ng cDNA in a reaction volume of 25 µl, 1x Brilliant II SYBR Green Q-PCR master mix, 200 nM reverse and forward primers and 30 nM Sybr Green. Thermo-cycling conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 30s, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. Gene expression values were calculated based on the comparative Δ CT-method and normalized to housekeeping genes (β_2 -microglobulin, actin).

Autophagy Assays: several assays were used to ascertain and quantify autophagy

- (1) Autophagy was induced by amino acid and serum starvation or treatment with rapamycin: Briefly, cells were washed three times with PBS and incubated for 6 to 9h in Hank's Buffered Salts Solution (HBSS) buffered with 2, 2 g/L NaHCO₃ and supplemented with 0, 1% BSA or with 100 mM rapamycin (LC Laboratories, Woburn, MA USA). Autophagic vacuoles were stained with monodansylpentane (MDH) as described by Nieman *et al* (28). Briefly, cells were grown on gelatine-coated glass cover-slips to approximately 60% confluency, then transferred into HBSS for 6h, washed with PBS, and incubated for 30 min with 200 µM MDH at 37°C in the dark then washed with PBS, and mounted with mowiol polymerizing agent for immediate observation under UV (λ_{ex} =359 nm) on a Leica DMLB microscope. Digital pictures were acquired with a Leica DC 300-F camera.
- (2) Degradation of radioactive L-[¹⁴C]valine-labeled long-lived proteins was measured as follows: cells were incubated for 24h in complete medium with 0, 1 µCi L-[¹⁴C]valine to label total proteins. Radioactivity was then pre-chased for 1h in complete medium in the presence of an excess of L-valine (10 mM) to remove the contribution of short-lived protein degradation. Finally, cells were incubated for 6 to 9h in either complete medium or HBSS in the presence or in the absence of 3-methyladenine (3-MA) and an excess of L-valine. Supernatants were collected and

free amino acids precipitated in 80% TCA, while proteins in the adherent cells were precipitated in 10% TCA. The radioactivity was quantified in a scintillation liquid analyzer Tri-Carb 2100TR (Packard). Proteolysis is expressed as the percentage of free radioactivity released into the supernatant relative to the total radioactivity.

- (3) Electron microscopy (EM) analyses of autophagy were done on cells fixed with 4% glutaraldehyde in PBS (pH 7.4), followed by 2% OsO₄ post-fixation. After dehydration in a graded series of ethanol, adherent cells were embedded in Epoxy resin and thin sections (60 to 70 nm) were cut on a Reichert Ultracut E microtome then stained with uranyl acetate and lead citrate for observation at 80 KV under a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

Time-lapse analysis: Time-lapse video-microscopy experiments were performed using a Zeiss Axiovert 200-M inverted microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) and the AxioVision 4.6 program. Dishes were placed inside an Incubator XL-3, on a heating insert M06 (37°C) topped with a CO₂-cover HM connected to a CO₂ controller that maintained the environmental CO₂ concentration at 5% for the duration of filming. Digital pictures were acquired and saved every 10 min over 48h using an AxioCam MR digital camera. The series of photographs were displayed as continuous time-lapse movies for analyses.

Western blots: Total proteins were extracted in 1% NP-40, 0, 5% sodium-deoxycholate, 0, 1% SDS supplemented with protease inhibitor cocktail from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Protein concentration was determined using Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA). Protein extracts were separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane (Millipore, St. Quentin-Yvelines, France) and revealed with ECL (Roche Diagnostics). Primary antibodies were used at 1/1000 dilution: mouse monoclonal anti-actin (MAB1501R, Millipore), rabbit polyclonal anti-Atg7 (600-401-487, Rockland, Tebu-Bio, Le Perray en Yveline, France), rabbit polyclonal anti-Bax (epitope: aa43-61, DakoCytomation, Trappes, France), mouse monoclonal anti-Bax^{2D2} (epitope: aa3-16, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA), mouse monoclonal anti-Bax^{6A7} (epitope: aa12-24, Beckman-Coulter), rabbit monoclonal anti-Bcl-x (1018-1, Epitomics, France), rabbit monoclonal anti-caspase 3 (sc-7272, Santa Cruz Biotech, Ca, USA), rabbit polyclonal anti-caspase 9 (556585, Pharmingen, BD Biosciences), rabbit polyclonal anti-caspase 8 (559932, Pharmingen, BD Biosciences), rabbit polyclonal anti-Mcl-1 (554103, Pharmingen, BD Biosciences). Rabbit antisera directed against human LC3 (L7543,

Sigma) was used at 1/250 dilution. HRP-conjugated secondary antibodies were from Biorad. Quantification was performed with the software ImageJ.

Immunocytochemistry: Cells were grown on gelatine-coated glass cover-slips. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 0, 1% SDS for 10 min, blocked with 3% BSA for 20 min, and then incubated with primary antibodies for 1h followed by secondary Alexa antibodies (Molecular Probes-Invitrogen) for 1h. Cells were finally mounted with Mowiol polymerizing solution, and observed under a confocal microscope (Leica TCS-SP1). Primary antibodies were: rabbit polyclonal anti-Bax (epitope: aa:43-61, DakoCytomation), mouse monoclonal anti- Bax^{6A7} (epitope: aa:12-24, Beckman-Coulter), mouse monoclonal anti-cytochrome c (cyt c; MAB897, R&D Systems, Lille France), mouse monoclonal anti-H2AX^{Ser139} (05-636, Millipore), mouse monoclonal anti-F₁-ATPase (Molecular Probes, Invitrogen) and rabbit polyclonal anti-F₁-ATPase a gift from Pr J. Lunardi. Blob Finder was used to calculate the number of H2AX foci in the cells from confocal microscopy images. Briefly, the z-stacks were pre-processed and projected into 2D image with a maximum intensity projection. The first step was to separate cell nuclei from image background using Otsu's method of threshold determination, which defines the threshold for all fluorescence images, each foci were identified as minimum 15x15 pixels (1 μm^2).

RESULTS

Characterization of human bone marrow MSCs

Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from human bone marrow (BM) samples as described by Pittenger *et al.* (14). After a few days in culture, BM cells became enriched with fibroblast-like cells, which became predominant after 2 weeks in culture (**Figure 1A**). The cell population was characterized by the flow cytometric analysis for the expression of CD105, CD90 and CD44 markers (**Figure 1B**). There was no detectable contamination of hematopoietic cells since cells were negative for markers of the hematopoietic lineage, including the lipo-polysaccharide receptor CD14, CD34, and the leukocyte common antigen CD45 (**Figure 1B**). The cells were able to differentiate into several lineages *in vitro*, including osteoblasts as described in Materials & Methods (**Figure 1C**). Our findings are in agreement with previous reports and show that our population is enriched with hMSCs (14, 15). The MSCs show a replicative senescent phenotype depending on the species from which the cells have been derived. Human MSCs cease to grow after about 20–30 population doublings due to senescence (16, 17). The most common characteristics of a senescent phenotype are a gradual decrease in the

proliferation potential and a decrease in differentiation capacity (18, 19). Thus to avoid the presence of senescent cells but also that of contaminant or differentiated cells, hMSCs were plated at an initial concentration of 5×10^4 to 10^5 and were used only between passage 2 and passage 10 (**data not shown**).

Difference in the sensitivity of differentiated and undifferentiated hMSCs to apoptosis

Contrary to the huge body of data available on the control of life and death of hematopoietic stem cells, very little data are available on the mechanisms of survival used by hMSCs (20). It has been shown that hMSCs were resistant to chemotherapy-induced apoptosis (8, 9), but the actual mechanism(s) of resistance of these cells to the cell death program were not determined. Previous results have shown that fetal MSCs are sensitive to both intrinsic/mitochondrial and extrinsic/receptor-mediated apoptotic pathways (6). We thus examined the response of the isolated hMSCs described in **Figure 1** to various cell death inducers such as staurosporine (STS), a broad kinase inhibitor, UV-irradiation and etoposide, both of which act mostly through DNA damage, induced apoptosis (21). As shown in **Figure 2A**, none of these treatments triggered cell death in hMSCs while K562, an erythroleukemia cell line was sensitive to all of these treatments. We conclude from these results that the hMSCs are resistant to mitochondrial intrinsic apoptosis.

Next, we investigated the response of these cells to extrinsic/receptor-mediated apoptotic pathway using the sensitivity to soluble Fas ligand (sFasL). Time-lapse experiments over 24h showed less than 10% cell death at 200 ng/ml sFasL with minimal activation of caspase 3 as assessed by cleavage of Ac-DEVD-AMC, a caspase substrate. Thus, even at very high concentrations of sFasL, hMSCs do not undergo apoptosis (**Figure 2B**) while at much lower concentrations (i.e. 50 ng/ml) sFasL induced apoptosis in human Glioblastoma cell lines (GBM) (**Figure 2B**), as previously described (17). Next, using caspase activity, a landmark of apoptosis, we compare the sensitivity toward etoposide-induced apoptosis of hMSCs to that of human foreskin fibroblasts obtained as described in materials and methods. As shown in **Figure 2C**, hMSCs were resistant to caspase induction by etoposide while human fibroblasts exhibited maximum caspase induction at the lowest concentration. As hypoxia and serum-deprivation induced apoptosis in rat MSCs (22), we examined the effect of hypoxia on the survival of hMSCs. As shown in **Figure 2D**, hypoxia did not induce apoptosis in these cells, on the contrary, however, proliferation was triggered as previously described (23).

The fact that caspase activity could not be induced in hMSCs upon etoposide treatment (**Figure 2C**), suggests that the mitochondrial apoptotic pathway could be impaired in these cells. Thus, we analyzed the expression of key proteins of the apoptotic program in these cells. As shown in **Figure 3A**, immunoblots reveal that hMSCs expressed all the key components of apoptosis belonging to the BCL-2 family of proteins, which control the initiator phase of apoptosis (24) such as the anti-apoptotic proteins Bcl-Xl and Mcl-1 and the pro-apoptotic protein Bax (**Figure 3A**). Of note, we found that these cells did not express Bcl-2 under these conditions. Similarly, hMSCs also expressed proteins essential to the execution phase of apoptosis such as caspase 3, 7, 8 and 9 (**Figure 3A**).

The release of cytochrome c (cyt c) from mitochondria is a major step in the execution of apoptosis (24). Using laser confocal microscopy, we analyzed the subcellular localization of cyt c in control and in etoposide-treated hMSCs. As shown in **Figure 3B**, no change in the localization of cyt c between control and etoposide-treated cells, suggesting that this important step is blocked in hMSCs. Upstream of the release of cyt c from the mitochondria, the redistribution of Bax from the cytosol to the mitochondria occurs very early after the induction of apoptosis (25). Bax association with mitochondria is associated with a change in the conformation of the protein that can be monitored using an anti-conformational antibody Bax^{6A7} (25). As shown in **Figure 3C**, upon etoposide treatment even at a low concentration (i.e. 50 µg/ml), Bax underwent this apoptotic change in conformation in hMSCs. Next, as our results suggested a block in Bax-induced apoptosis, we analyzed the importance of the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-Xl using lentiviral RNA interference (see materials & methods). As illustrated in **Figure 3D**, shRNA Bcl-Xl efficiently down-regulated Bcl-Xl expression. The down-regulation of Bcl-Xl sensitized hMSCs to a low concentration of etoposide (i.e. 50 µg), which otherwise did not trigger apoptosis in hMSCs infected with control scrambled shRNA (scr-shRNA) (**Figure 3E**). These results confirm the importance of the expression of these anti-apoptotic proteins in hMSCs survival.

Next, we examined in detail the mechanism by which etoposide induced cell death in hMSCs, differentiated along the osteogenic pathway as shown in **Figure 1C**. Cell death was determined by Trypan blue exclusion on hMSCs incubated in osteogenic differentiation media from 0 to 3 weeks in the absence or in the presence of etoposide. The results depicted in **Figure 4A** show that the initiation of differentiation sensitized these cells to cell death. In effect, as early as one week after the induction of differentiation, etoposide was able to engender a slight but distinct cell death. To verify the type of cell death was detected, the cells were analyzed by APO 2.7 labeling (**Figure**

4B). The results presented in **Figure 4B** illustrate that the cell death observed was apoptotic and this was validated by the measurement of caspase activity detected in the cells shown in **Figure 4C**. These results show that cell death induced by etoposide observed upon osteogenic differentiation is associated with apoptotic markers (i.e. APO 2.7 and caspase activity).

DNA double strand breaks (DSB) induced by ionizing radiation is characterized by the presence of phosphorylated H2A.X (γ -H2A.X). The sustained expression of γ -H2AX is associated with the lack of DNA repair and apoptosis (26). We thus examined the effect of a 5-Gy irradiation on DNA-repair by visualizing and quantifying γ -H2A.X foci in undifferentiated and in differentiated cells. As shown in **Figure 5A and B**, while the number of γ -H2A.X foci decreased with time after exposure to gamma-irradiation in undifferentiated cells, the level was maintained in differentiated hMSCs. This result suggest that cell death was also increased in these cells by a decrease in the DNA damage response as previously reported for aging stem cells (12, 13). However, it should be noted that the response of differentiated hMSCs to apoptosis was also increased during STS treatment (**data not shown**), suggesting that the apoptotic machinery or other cell survival pathway were also affected.

Autophagy is constitutively activated in undifferentiated MSCs but is inhibited during differentiation.

Macroautophagy (often referred as autophagy) is induced in most cells by nutriment deprivation but can also be constitutive in some tissue where it ensures cellular component turnover (27). This highly dynamic process is used to degrade cytoplasmic proteins as well as entire organelles in specialized vesicles characterized by the presence of a double membrane, known as the autophagosomes. Autophagosomes fuse with lysosomes to achieve the degradation (27). Since serum and amino acid deprivation induced cell growth arrest and only a modest increase in the percentage of cell death ($3.76\% \pm 0.5$) after 72 hours; we analyze the presence of autophagosomes in hMSCs under both normal and during serum starvation by several techniques: electron microscopy, MDH staining and LC3 (Atg8) cleavage. As shown in **Figure 6A**, electron micrographs show the presence of autophagosomes both under normal and starvation conditions. Of note, the number and the size of the autophagy related vacuoles were increased under serum and amino acid starvation. Since these vacuoles were reminiscent to that observed during autophagy, we analyzed by immunoblots the pattern of expression of the cleavage of LC3 protein, which is one of the features of autophagy

(27). As shown in **Figure 6B**, LC3 was present in two forms in hMSCs, namely LC3-I and LC3-II, the latter form being usually associated with autophagic activity (27). Again, in control cells LC3 cleavage was observed and was increased upon starvation in hMSCs. The labeling of hMSCs by the lysosomotropic agent MDH, another marker of autophagy (28), is also increased upon starvation in the hMSCs (**Figure 6C**). Note that the MDH labeling was abolished upon incubation of hMSCs with growth factors that promote neural (**Figure 6C**) or osteogenic differentiation (**Figure 6D**). Of note, in differentiated cells even if autophagy was largely abolished it could still be induced by serum and amino acid withdrawal or rapamycin treatment (**Figure 6D**). One of the hallmarks of autophagy is the high rate of degradation of long-life proteins that can be monitored by L-[¹⁴C]valine measurements as described in materials and methods. We did not use osteogenic differentiation as it is associated with an important increase in proteolysis (see 29), which interfere with this assay (**data not shown**). hMSCs can differentiate into several lineages upon incubation with specific growth factors such as a mixture of bFGF, EGF and BDNF (see materials and methods). These growth factors have been shown to trigger a neuronal-like differentiation in these cells (30, 31). Although no change in the overall morphology can be observed in these cultures, an increase in the expression of GFAP, a marker of astrocyte differentiation, could be measured by Q-PCR in BDNF-treated cells as expected (**data not shown**) and as previously reported (30). Using this method, we found that proteolysis activity was higher in undifferentiated hMSCs than in differentiated cells and that only a small increase in the proteolytic activity was induced by a serum and amino acid starvation in both undifferentiated and differentiated hMSCs (**Figure 7A**). The fusion between autophagosomes and lysosomes, which generates autolysosomes marks the completion of the autophagic pathway and this step is inhibited by Bafilomycin A1 (32). As illustrated, Bafilomycin A1, inhibited autophagic-associated proteolysis induced by serum and amino acid starvation (**Figure 7A**), but do not interfere with cell death unless it was associated with etoposide (**Figure 7B**). Atg7 is a protein central in the Autophagy pathway and the silencing of this protein has been shown to interfere with this program (33). Thus, we analyzed the importance of this protein in the survival of undifferentiated hMSCs by silencing its expression using RNA interference. shRNA directed against Atg7 efficiently reduced the expression of the protein (**Figure 7C**). The influence of this silencing on hMSCs survival was assessed and as previously observed with Bafilomycin A1 the inhibition of autophagy *per se* had no influence on its survival unless associated with an inducer of apoptosis such as etoposide (**Figure 7D**).

We next investigated the sensitivity of hMSCs toward cell death upon the induction of differentiation along the adipogenic or neuronal pathways. Cells were differentiated then

subjected to an etoposide treatment as described in **materials and methods**. **Figure 8A** shows pictures of cells engaged in adipogenic differentiation treated or not with etoposide. In agreement with our previous observations, only cells engaged along the differentiation pathway were sensitive to cell death (**Figure 8B**). Similarly, hMSCs that were cultured in the presence of bFGF/EGF and then BDNF to induce neuronal differentiation were sensitive to etoposide at a concentration, which did not affect the cells treated only with bFGF/EGF (**Figure 8C**). Note that the treatment with etoposide was done in the absence of BDNF since BDNF is a survival factor and prevented cell death when present. The decrease in cell viability was due to an increase in apoptosis as observed by the induction of caspase activity under these conditions (**Figure 8C**).

Discussion:

During the course of an entire lifespan, tissue repair and regeneration is made possible by the presence of adult stem cells. Stem cell expansion, maintenance and differentiation must be tightly controlled to assure longevity. In particular, control of DNA integrity is of extreme importance in stem cells as any genetic alterations might have repercussions in its lineage and possibly interfere with regenerative properties (19). It is believed that DNA damage is involved in the loss of function of hematopoietic stem cells and that it is part of the ageing process (12, 13). DNA damage is a powerful inducer of apoptosis and both have been incriminated in stem cell exhaustion and thus in the loss of the regenerative capacity (34). MSCs are present in adult bone marrow, adipose tissue, dermis and muscles (1-3). These MSCs as stem cells undergo asymmetric division to give rise to identical MSCs (self-renewal) and cells destined to sustain tissue homeostasis and/or repair through differentiation (1-3). MSCs are also the source of factors that could play a major role in the regenerative processes and immuno-regulation under normal and pathological conditions (1). It is believed that these stem cells are rare long-living slow dividing cells that can produce upon specific stimuli multiple lineages, mostly osteocytes, chondrocytes and adipocytes but also non-mesenchymal lineages such as hepatocytes, neurons or astrocytes (1-3). Thus, understanding the response of hMSCs to DNA damage and/or to apoptotic inducers is important to understand the mechanism that might underlie the ageing process.

We thus use hMSCs from middle-aged donors, in short-term cultures and for a limited number of passages to avoid the interference with senescence (**Figure 1**). In this study, we show that hMSCs resist to potent apoptosis inducers at concentrations that otherwise kill resistant cancer cells such as K562 erythroleukemia cell line or human glioma cells as

well as primary cultures of human fibroblasts (**Figure 2**). The nature of the intrinsic resistance to apoptosis implies the inhibition of the mitochondrial intrinsic pathway as demonstrated by the lack of cyt c release upon the induction of apoptosis (**Figure 3**). In addition, the silencing of the expression of Bcl-Xl leads to an increased sensitivity to etoposide, which is not complete, probably because hMSCs express other anti-apoptotic members of the BCL-2 family such as Mcl-1 (**Figure 3**). Of note, the combination of hypoxia and starvation has been shown to induce apoptosis in rat MSCs through a mitochondria-dependent pathway (22) suggesting that resistance to apoptosis, like its counterpart senescence, could be more specific to hMSCs. Upon addition of osteogenic differentiating factors and before any obvious morphological differentiation, hMSCs shift their sensitivity toward apoptosis inducers (**Figure 4**). To complement to this observation, undifferentiated hMSCs exhibit an important DNA repair activity, which is diminished during differentiation (**Figure 5**). It should be noted that the latter property could also contribute to the resistance to DNA damaging-induced apoptosis. The mechanisms that govern these important changes are not known but one could postulate that these features are involved in the elimination of damaged hMSCs. Similar features have been reported for embryonic stem cells (35) and in terminal muscle differentiation (36). Another striking difference is the suppression of autophagy during the transition from the undifferentiated cells to the commitment into differentiation (**Figure 6**). We have observed that the inhibition of autophagy has a direct effect on the survival of undifferentiated hMSCs (**Figure 7**). Although several studies have shown that autophagy can rescue cells under starvation, its association with a defective apoptosis in order to prevent cell death of non-transformed cells under normoxia and normal nutriment conditions is more rare (37). From our studies, we conclude that an active inhibition of apoptosis and a high autophagic activity are involved in the survival of these hMSCs. Of note, the acquisition of a sensitivity of differentiated cells to apoptotic cell death and abolition of autophagy are not restricted to osteogenic differentiation but is also observed during adipogenic and neuronal differentiation (**Figures 7 and 8**). Of note, no change in the expression of key proteins of the apoptotic machinery was observed except for an increase in the expression of Bcl-2, an anti-apoptotic protein (**data not shown**). Thus the molecular mechanisms involved in the shift from the resistance to apoptosis remains to be established.

After an initial sharp decline in the number of MSCs at birth, the population of these cells decline slowly but steadily throughout adult life (1). Human fetal MSC have been shown to be sensitive to apoptosis while in this study we found that the adult cells are highly resistant to similar apoptosis inducers. It is possible that the apoptosis sensitive hMSC

population is eliminated at birth or during early aging and that only apoptosis resistant cells are selected. One could propose that the resistance to cell death inducers allow not only the protection of hMSCs against chemotherapy, as reported by Mueller *et al.* (9), but also their long-term survival. Recent work by Inomata *et al.* (38) has shown that genotoxic stress can also induce differentiation in hMSCs thereby withdrawing these cells from the renewal cycles. From our results, we could conclude that this type of differentiation could be used as a safeguard since, once differentiated, hMSCs would become sensitive to any additional DNA damage. Another conclusion from our work is that the capacity of MSC to undergo both autophagy and cellular senescence, two tumor suppressor mechanisms, would allow the inhibition of growth and thus reduce the risk of malignancy despite the inhibition of apoptosis.

Acknowledgments: this work was supported by grants from INSERM (Insitut National de la Santé et la Recherche Médicale) and a special grant from the "Ligue Nationale contre le Cancer" (programme Equipe Labellisée).

Disclosures: The authors report that they have no potential conflicts of interest. (5005 words)

References:

1. Caplan CI. Adult Mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007; 213:341-347.
2. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Rev. Immunol.* 2008; 8:726-736.
3. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization *Int. J. Biochem & Cell Biol.* 2004; 36:568-584.
4. Valtieri M, Sorrentino A. [The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis.](#) *J Cell Physiol.* 2008; 217:296-300.
5. Streetz KL, Doyonnas R, Grimm D, et al. Hepatic parenchymal replacement in mice by transplanted allogeneic hepatocytes is facilitated by bone marrow transplantation and mediated by CD4 cells. *Hepatology.* 2008; 47:706-718.
6. Kennea NL, Stratou C, Naparus A, et al. Functional intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human fetal Mesenchymal stem cells. *Cell Death Diff.* 2005; 12:1439-1441.
7. Li W, Ma N, Ong LL, et al. [Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function.](#) *Stem Cells* 2007; 25:2118-2127.
8. Li J, Law HKW, Lau YL, et al. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol.* 2004; 127:326-334.
9. Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, et al. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells* 2006; 24: 2753-2765.
10. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132:27-42.

11. Tooze SA, Schiavo G. Liaisons dangereuses: autophagy, neuronal survival and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2008; 18:504-515.
12. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, et al. [Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age.](#) *Nature.* 2007; 447:725-729
13. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature.* 2007; 447:686-690.
14. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-147.
15. Ishii M, Koike C, Igarashi A, et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332:297-303.
16. Wagner W, Horn P, Castoldi M, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE.* 2008; 3:e2213.
17. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006; 7:14
18. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, et al. [Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells.](#) *Bone* 2007; 33:919-926.
19. Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8:703-713.
20. Oguro H, Iwana A. Life and death in hematopoietic stem cells. *Curr. Opinion Immunol.* 2007; 19:503-509.
21. Batista LF, Kaina B, Meneghini R, et al. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res.* 2009; 681:197-208.
22. Zhu W, Chen J, Cong X, et al. Hypoxia and Serum Deprivation-Induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2006; 24:416-425.
23. Ren H, Cao Y, Zhao Q, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Com.* 2006; 347:12-21.
24. Er E, Oliver L, Cartron PF, et al. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757:1301-1311.
25. Hsu YT, Youle RJ. [Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations.](#) *J Biol Chem.* 1998; 273:10777-10783.
26. Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand repair. *FEBS J.* 2005; 272:3231-3240.
27. Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell.* 2008; 15:344-357.
28. Niemann A, Baltes J, Elsässer HP. Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. *J Histochem & Cytochem.* 2001; 49:177-185.
29. Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, et al. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006 24:475-481.
30. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000; 61:364-370.
31. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000; 164:247-256.
32. Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, et al. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy.* 2008; 4:849-950.
33. Juhász G, Erdi B, Sass M, et al. Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 2007; 21:3061-3066.

34. Ruzankina Y, Asare A, Brown EJ. Replicative stress, stem cells and aging. *Mech. Ageing Dev.* 2008; 129:460-466.
35. Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 2008; 26:2226-2274.
36. [Narciso L](#), [Fortini P](#), [Pajalunga D](#), et al. Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. [Proc Natl Acad Sci U S A.](#) 2007; 104:17010-17015.
37. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, et al. Does autophagy have a license to kill mammalian cells. *Cell Death Diff.* 2009; 16:12-20.
38. Inomata K, Aoto T, Nguyen TB, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell* 2009; 137:1088-1099.

Legends of figures:

Figure 1: Characterization of *in vitro* hMSCs.

A) Cell morphology: hMSCs were cultured in complete medium then photographed as described in materials and methods. Note the fibroblast-like morphology of the cells. **B)** Markers (FACS): Results are represented as FACS histograms, the gray line corresponds to the isotype control and the solid black line to the specific antibody tested. Data shown are representative of at least three independent experiments. **C)** hMSCs were cultivated for 4 weeks in DMEM medium containing 20% FBS (untreated) or hMSC Osteogenic Differentiation medium (treated). Matrix mineralization was determined by alizarin red staining and visualized under a Nikon TMS microscope, magnification x20.

Figure 2: Deficiency in cell death in hMSCs

A) Induction of cell death using staurosporine (STS), UV-irradiation and etoposide (Eto) in K562 cells and hMSCs. The cells were plated at 5×10^4 cells/ml in 24-well plates. 24h later the different apoptosis inducing agents were added to the culture medium and the cells were analyzed over 48h using video-microscopy with an acquisition every 10 min. The number of dead cells was determined at each time point and rounded up for every hour. The results are presented as the percentage of dead cells in treated cultures versus untreated cultures. The number of cells analyzed was about 100 per condition. The results are representative of three independent experiments and of 5 different hMSC cultures.

B) Effect of soluble Fas ligand (sFasL) on hMSCs. The effect of hMSCs cultured in the absence or in the presence of increasing concentrations (50, 100, 150, 200 and 250 ng/ml) sFasL was analyzed by time-lapse microscopy over 24h at 10 min intervals. Cell death was determined at every acquisition as described in **A**.

C) Same as A, but hMSCs were treated for 24h then lysed and the caspase activity determined in 10-20 μ g cell lysate using Ac-DEVD-AMC as a substrate. Primary cultures of human fibroblasts were used as a control as described in the materials and methods section.

D) Effect of hypoxia on hMSCs survival. Human MSCs were cultured for 24h under normoxia (20% O₂) or hypoxia using a hypoxia work-station (Invivo₂ 400 Ruskinn Life Sciences, 3M) at 3% O₂, 5% CO₂ in 95% humidified air. Note that experiments shown are representative of hMSCs obtained from at least five different donors.

Figure 3: Absence of release of cyt c despite the activation of Bax in hMSCs

A) Immunoblot analyses of some of the main components of the apoptotic machinery. Total protein extracts were performed and 50 µg protein was analyzed on a 12% SDS-PAGE. Immunodetections were performed with the antibodies mentioned in the material and methods section.

B) Laser confocal analyses of cyt c upon etoposide treatment of hMSCs. Cells cultured in the absence (untreated) or in the presence of 50 µg/ml etoposide (Eto) for 24h were fixed then labeled with polyclonal anti-F₁-ATPase and Alexa-488 and then with monoclonal anti-cyt c and Alexa-568. Laser confocal analyses were done as described in the material and methods section.

C) Laser confocal analyses of Bax upon etoposide treatments of hMSCs. Cells cultured in the absence (untreated) or in the presence of 50 µg/ml Etoposide (Eto) for 24h were fixed then labeled with polyclonal anti-F₁-ATPase and Alexa-488 and then with monoclonal anti-Bax^{2D2} (2D2: recognizes all forms of Bax) and/or anti-Bax^{6A7} (6A7: recognizes only the activated form of Bax) and Alexa-568. Laser confocal analyses were done as described in the material and methods section.

D) Knock-down of Bcl-XI in hMSCs. hMSCs were infected with lentiviral particles containing sh-Bcl-XI or scr-shRNA. Western blot analysis showed that the knock-down of Bcl-XI was about 90%.

E) The sensitivity of the hMSCs-shBcl-XI and hMSCs-shscr to apoptosis was determined by culturing the cells in the absence or in the presence of 50 µg/ml etoposide (Eto). The cells were analyzed over 48h using video-microscopy with an acquisition every 10 min. The number of dead cells was determined at each time point and rounded up for every hour. The results are presented as the percentage of dead cells in treated cultures versus untreated cultures. The number of cells analyzed was about 100 per condition. The results are representative of three independent experiments.

Figure 4: Sensitivity to cell death was acquired after induction of differentiation

A) hMSCs were cultured in control medium or osteogenic differentiation medium for 0, 1, 2 or 3 weeks and in the absence or in the presence of 50 µg/ml Etoposide. The number of non-viable cells was quantified by Trypan blue exclusion counting a minimum of 200 cells per condition. The data presented represent three independent experiments.

B) The cells were cultured as in (A) and then trypsinized and the number of apoptotic cells was determined by FACS using APO 2.7-PE as described in materials and methods. The results are representative of three independent experiments.

C) The cells treated as in **(B)** were collected and 10 µg whole cell lysates were assayed for caspase activity using Ac-DEVD-AMC as a substrate. The results are expressed as arbitrary units of caspase activity per mg protein.

Figure 5: DNA repair capacity in undifferentiated and differentiated hMSCs

A) Quantification of DNA repair. Human MSCs that were either induced to differentiate into osteoblasts (bottom) or cultured in DMEM (top) were subjected to γ -irradiation (5-Gy) and then at different time points the cells were fixed then labeled with a monoclonal mouse anti-human HA2.X^{Ser139} and the nuclei were stained with Draq5.

B) The number of γ -HA2.X foci in the nuclei was quantified using the Blobfinder analysis (bottom). An average of 100 nuclei was analyzed at each time point.

Figure 6: hMSCs and autophagy

A) Electro-micrographs of hMSCs cultured in the absence or in the presence of HBSS for 6h prior to analysis by electron microscopy to visualize the presence of autophagic vacuoles (marked by arrows) in cells cultured in complete media (con) or serum and amino acid deprived media (HBSS).

B) Immunoblotting of LC3-I cleavage in hMSCs. hMSCs were cultured in complete medium or in HBSS for 24h and then the cells were lysed in RIPA buffer with 5 cycles of freeze-thaw. 50 µg whole cell lysate were loaded on 15% SDS-PAGE. Western blots show the starvation-induced conversion of LC3-I into LC3-II in the presence of E-64d (20 µg/ml) and leupeptin (20 µg/ml) to prevent the degradation of intra-autophagosomal LC3-II.

C) MDH labeling of hMSCs cultured in complete (con), serum deprived (HBSS) or EGF/bFGF/BDNF complete media (+BDNF). Images are representative of at least 4 independent experiments.

D) MDH labeling of hMSCs differentiated into osteoblast then cultured either in complete media (osteo), under starvation conditions (HBSS) or in complete media supplemented with 100 µM rapamycin (Rapamycin). Pictures are representative of at least 4 independent experiments.

Figure 7: Effect of differentiation on autophagic activity and the effect on hMSCs survival

A) Proteolytic activity of undifferentiated and BDNF-treated hMSCs. Differentiation was induced along the neuronal pathway in hMSCs by culturing the cells for 48h with bFGF and EGF and then for 24h with BDNF. Undifferentiated hMSCs (-BDNF) and differentiated

hMSCs (+BDNF) were incubated in the presence of L-[14C]valine, then chased for 9h in complete medium (con), HBSS alone or HBSS supplemented with 0, 1 μ M Bafilomycin A1 (Baf). The results show the stimulation of proteolysis relative to the respective basal levels measured under non-starving conditions (con). The values are the mean of at least 3 independent experiments \pm SD.

B) Effect of Bafilomycin A1 (Baf) and/or Eto on cell survival. hMSCs were incubated either in the absence (con: solid circles) or in the presence of 0, 1 μ M Baf (Baf: open circles) for 6h, then treated (Baf+Eto: open squares) or not with 50 μ M Etoposide (Eto: solid squares). Cell death was quantified by time-lapse over 48h with an acquisition every 10 min. The number of dead cells was determined at every time point. The graphs are representative of three independent experiments.

C) Effect of the shAtg7 on cell survival. Western blot analysis of hMSCs infected with shAtg7 or shLuciferase (shLuc) shows the almost complete knock down of Atg7 in these cells. These hMSCs infected with GFP-shAtg7 or GFP-shLuciferase (shLuc) were cultured in HBSS for 24h and then stained with MDH. The cells labeled with GFP were analyzed for MDH staining. Note that there is a crossover staining between GFP and MDH.

D) Induction of apoptosis in shAtg7-infected hMSCs. The quantification of the percentage of cell death in shAtg7 hMSCs cultured in the absence or in the presence of 50 μ g/ml etoposide (Eto) was assessed by time lapse as described in **(B)**.

Figure 8: Sensitivity of adipogenic and neuronal engaged hMSCs toward etoposide-induced apoptosis

A) Induction of apoptosis in hMSCs and adipocytes. Pictomicrographs of adipogenic differentiated hMSCs and hMSCs cultured in the absence or in the presence of 50 μ g/ml Etoposide for 18h. Images are representative of 4 independent experiments.

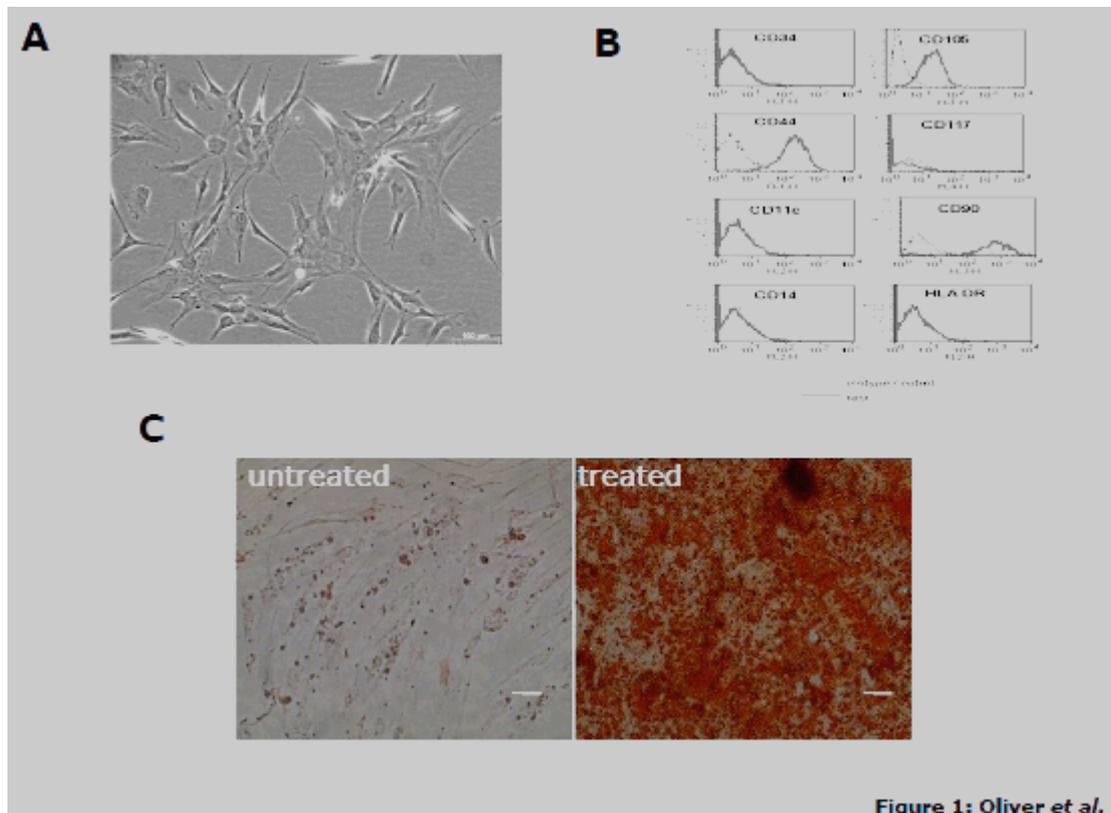
B) Cell survival of hMSCs, preadipocytes (preadipo) and human foreskin fibroblasts (hfibro) cultured in the absence or in the presence of 50 μ g/ml Etoposide (Eto) for 24h was determined by Trypan blue exclusion, counting about 200 cells under each condition. The data are representative of 3 independent experiments.

C) Cell lysates from control hMSCs or hMSCs induced to differentiate along the neuronal pathway (10 μ g/ml BDNF) were cultured in the absence or in the presence of 50 μ g/ml Etoposide (Eto) for 24h were assayed for caspase activity using Ac-DEVD-AMC.

Antibody	Distributor	Reference
CD 11c-PE	BD-Pharmingen	555392
CD 41-PE	Immunotech	AO-7764
CD 34-FITC	Immunotech	PNIM-1870
CD 44-FITC	AbD Serotec	MCA-89F
CD 90-PC5	Beckman Coulter	PNIM-3703
CD 105-FITC	AbD Serotec	MCA-1557F
CD 117-APC	Beckman Coulter	PNIM-3638
HLA DR-PE	Immunotech	464

Target	Sequence	Reference
shAtg7	5'-AGGATACAGCTGGAGTCAG-3'	
shLuciferase	5'-GTGCGTGTTCGTAATACTATT-3'	
shBcl-XI	CCGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAATCTCGAGAT TTCCGACTGAAGAGTGAGCTTTTG	TRCN0000033499
shBcl-XI	CCGGGTGGAAGTCTATGGGAACAATCTCGAGATT GTCCCATAGAGTCCACTTTTG	TRCN0000033500
shBcl-XI	CCGGGTTTAGTGATGTGGAAGAGAAGTCTCGAGTT CTCTCCACATCACTAAACTTTTG	TRCN0000033501
shBcl-XI	CCGGAGAGCTTTGAACAGGATCTTCTCGAGAAG TATCCTGTTCAAAGCTCTTTTG	TRCN0000033502
shBcl-XI	CCGGCGACGATTTGAACTGCGGTACTCGAGTACC GCAGTCAAACCTCGTCTTTTG	TRCN0000033503

Suppl. Table : List of antibodies and sequences of oligonucleotides used in this study.



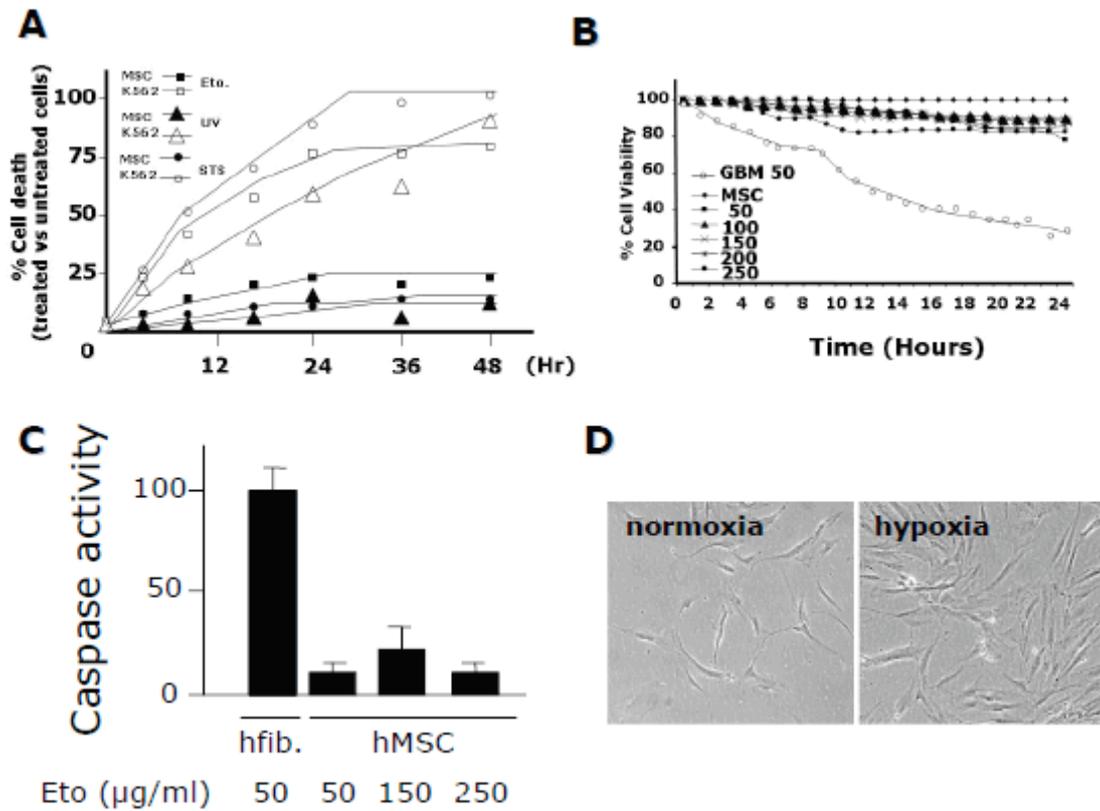


Figure 2: Oliver et al.

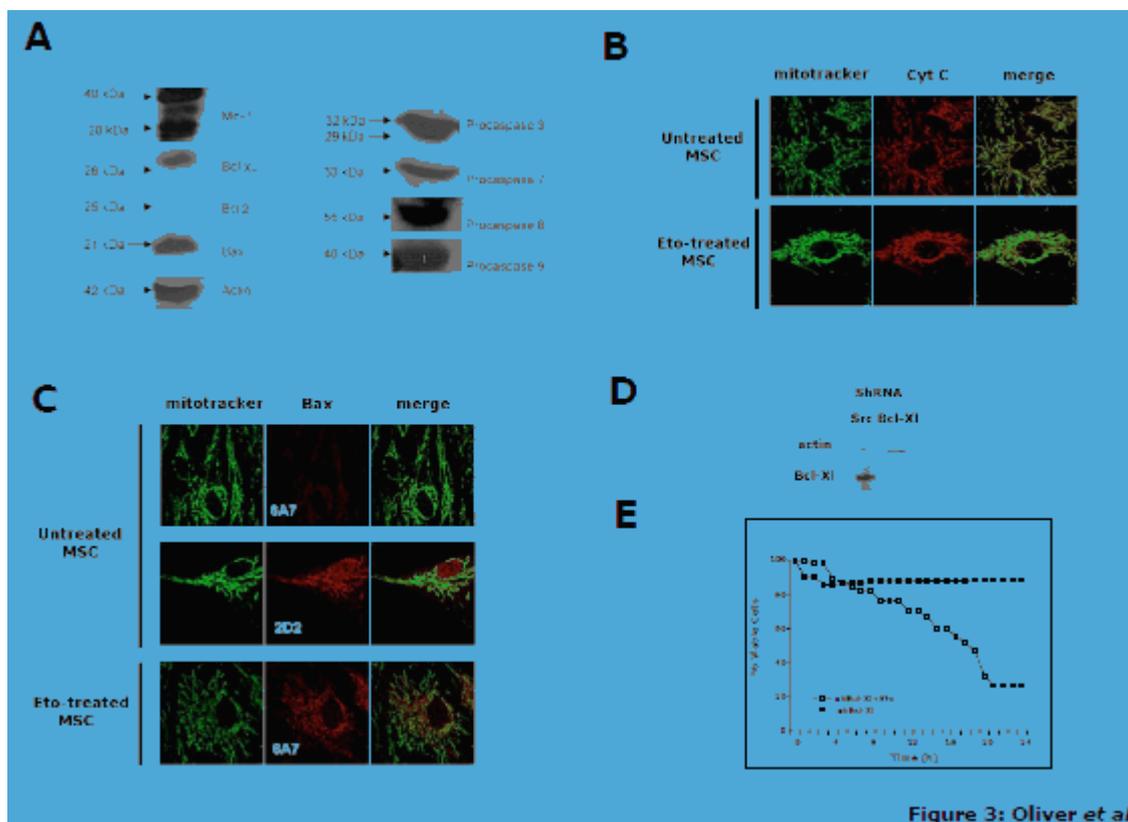


Figure 3: Oliver et al.

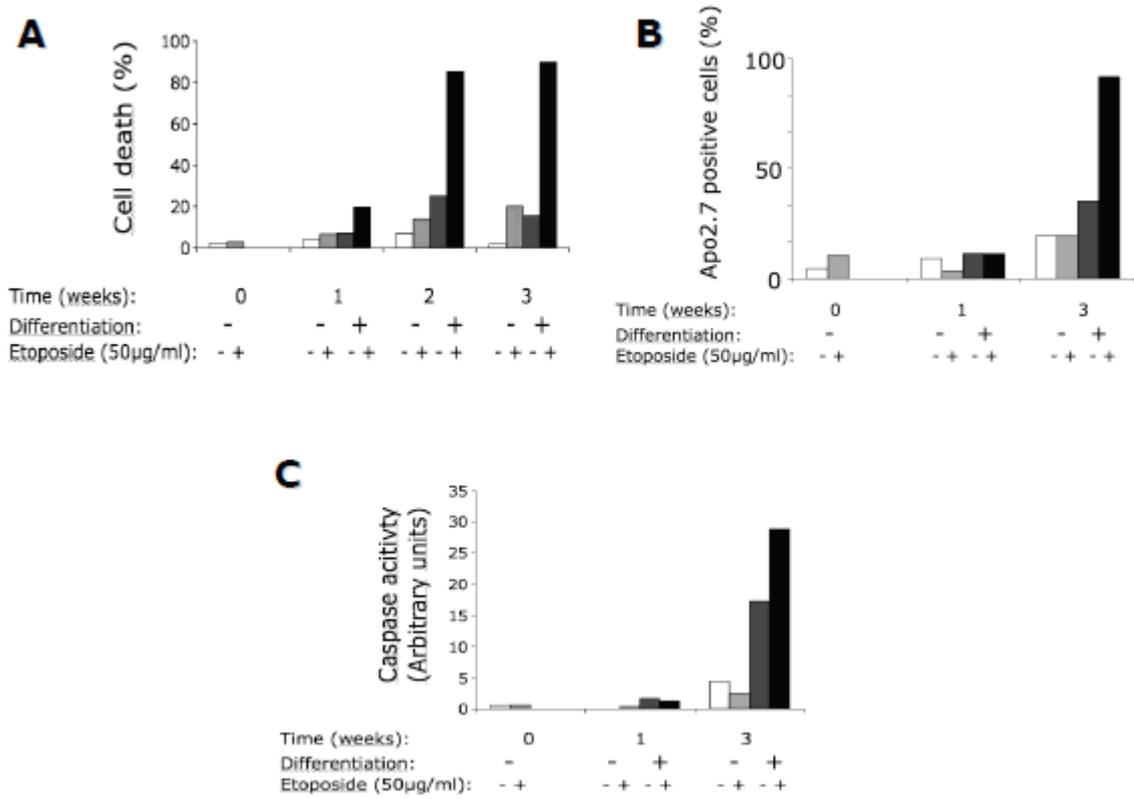
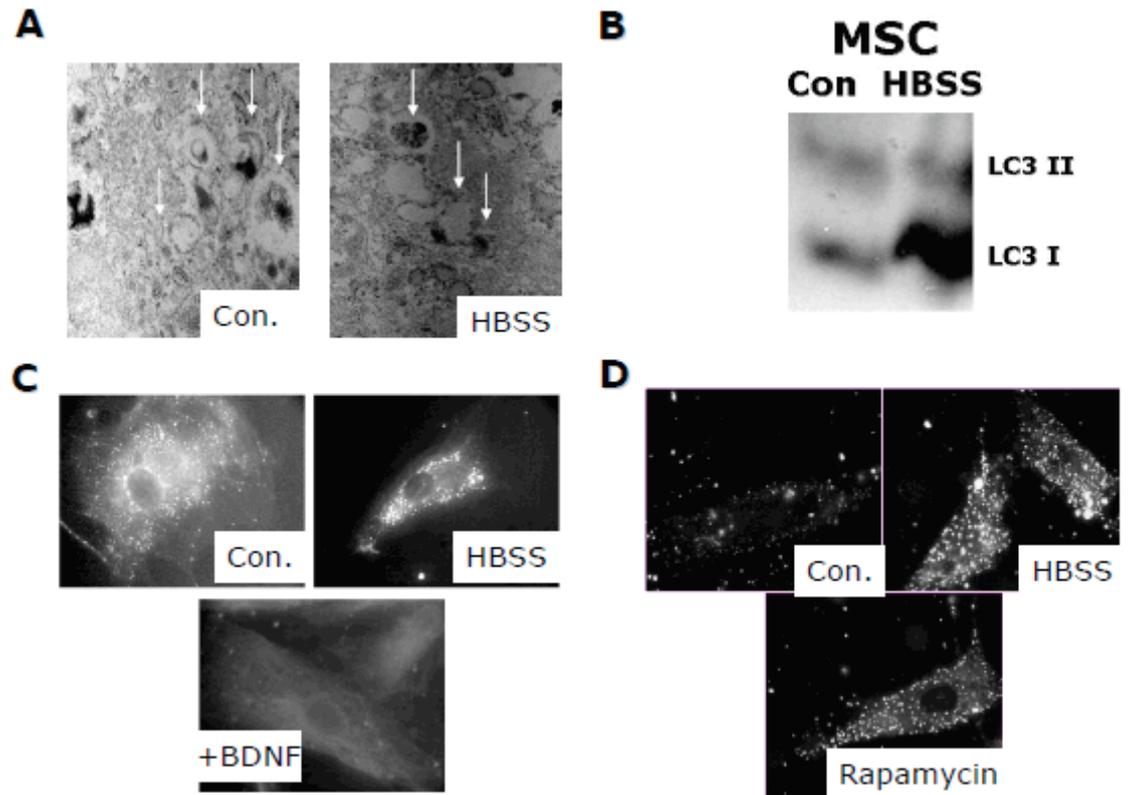
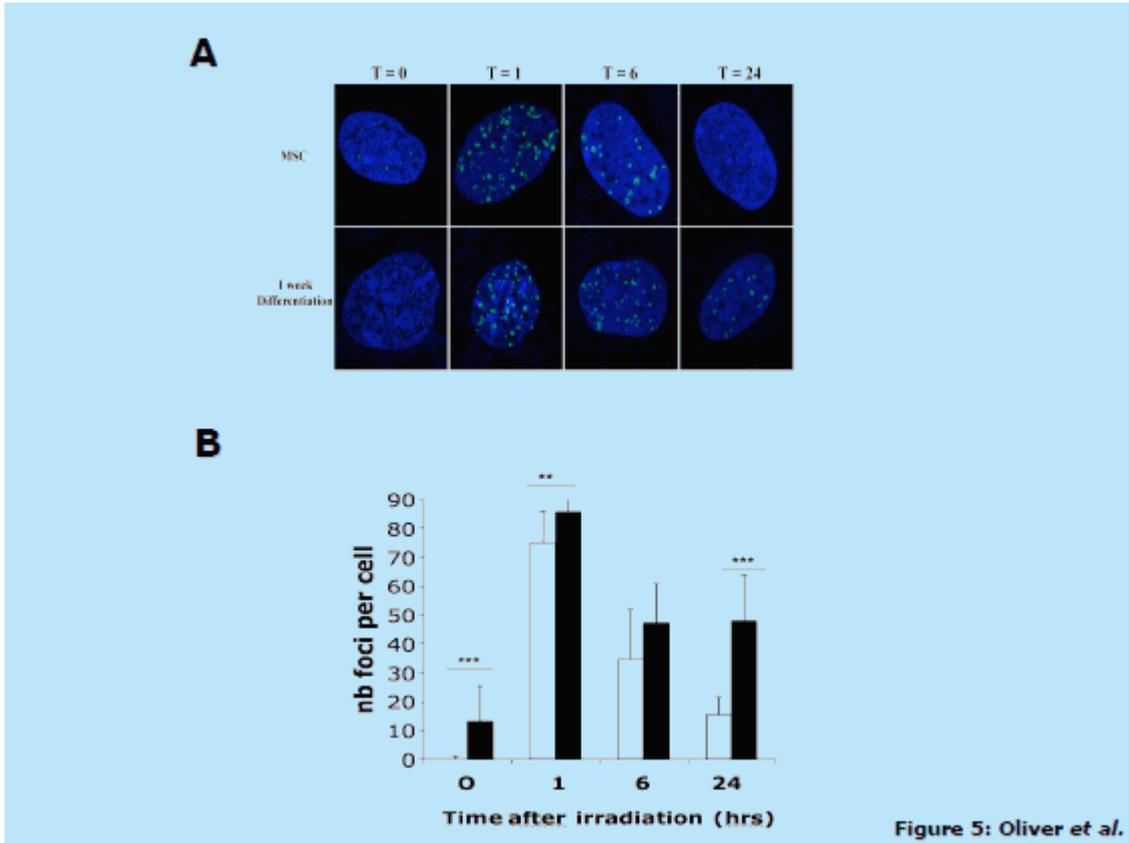


Figure 4: Oliver et al.



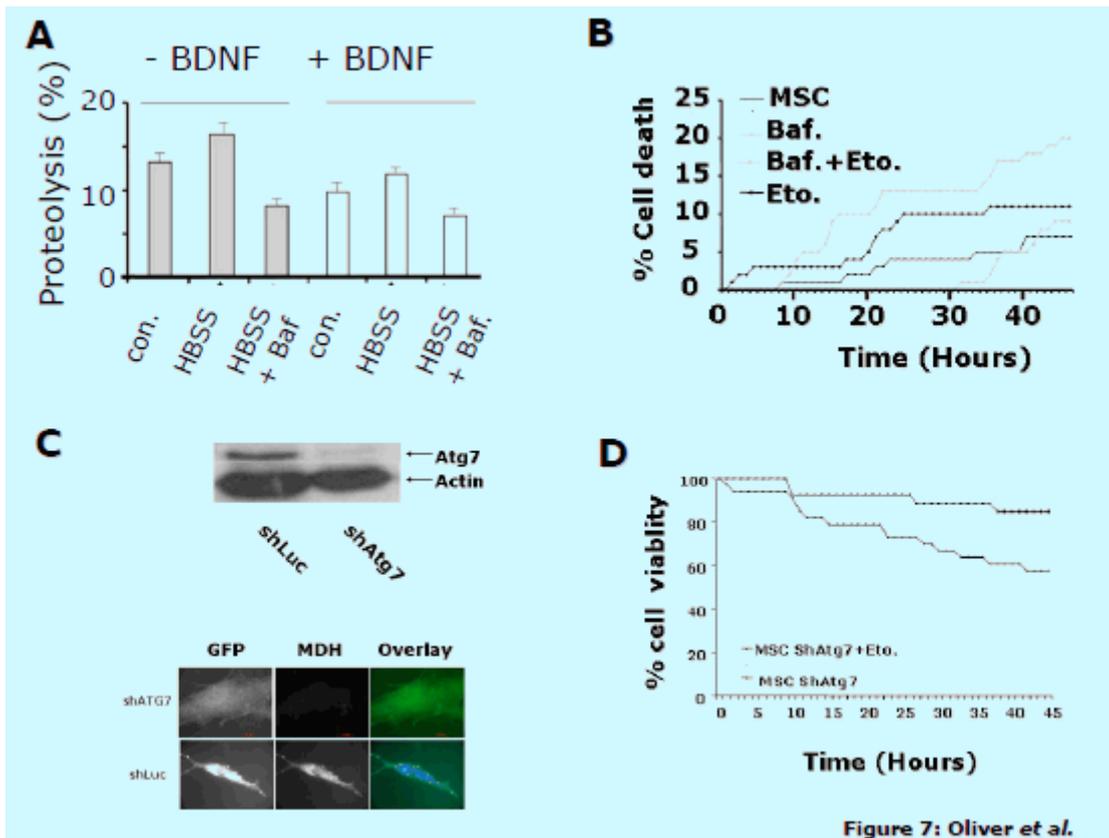


Figure 7: Oliver et al.

ANNEXE 2 : Index des protéines présentes dans les réseaux

Symbole	Nom du gène	Numéro d'accès GenPept UniProt Swiss-Prot	Localisation	Type	ID du gène pour l'Homme
ACO2	aconitase 2, mitochondrial	Q99798	Cytoplasme	Enzyme	50
ALB	albumin	P02768	Espace extracellulaire	Transporteur	213
ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	P30837	Cytoplasme	Enzyme	219
ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate	P04075	Cytoplasme	Enzyme	226
ANXA2	annexin A2	P07355	Plasma Membrane	autre	302
ARSG	arylsulfatase G	Q96EG1	Espace extracellulaire	Enzyme	22901
ASCL2	achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila)	--	Noyau	Régulateur de la transcription	430
ATF1	activating transcription factor 1	--	Noyau	Régulateur de la transcription	466
CALB1	calbindin 1, 28kDa	P05937	Cytoplasme	autre	793
CALD1	caldesmon 1	Q05682	Cytoplasme	autre	800
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	--	Cytoplasme	peptidase	836
CBR1	carbonyl reductase 1	P16152	Cytoplasme	Enzyme	873
CCNB1	cyclin B1	--	Noyau	autre	891
CD200	CD200 molecule	P41217	Plasma Membrane	autre	4345
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	--	Noyau	kinase	1026
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	--	Noyau	Régulateur de la transcription	1029
CEACAM8	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	--	Plasma Membrane	autre	1088
CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	--	Espace extracellulaire	Enzyme	1116
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	--	Noyau	Régulateur de la transcription	1385
CTSD	cathepsin D	P07339	Cytoplasme	peptidase	1509
CYCS	cytochrome c, somatic	--	Cytoplasme	Enzyme	54205
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	--	Noyau	Régulateur de la transcription	1649
DLD	dihydropolipoamide dehydrogenase	P09622	Cytoplasme	Enzyme	1738
EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	P26641	Cytoplasme	translation regulator	1937
ENO1	enolase 1, (alpha)	P06733	Cytoplasme	Régulateur de la transcription	2023
ENO3	enolase 3 (beta, muscle)	P13929	Cytoplasme	Enzyme	2027
ESR1	estrogen receptor 1	--	Noyau	ligand-dependent nuclear receptor	2099
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	--	Noyau	Régulateur de la transcription	2353
FUBP1	far upstream element (FUSE) binding protein 1	Q96AE4	Noyau	Régulateur de la transcription	8880
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	Q14697	Cytoplasme	Enzyme	23193
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	Cytoplasme	Enzyme	2597
GLI1	glioma-associated oncogene family zinc finger 1	--	Noyau	Régulateur de la transcription	2735
GSN	gelsoline(amyloidosis, Finnish type)	P06396	Espace extracellulaire	autre	2934
HNF1A	HNF1 homeobox A	--	Noyau	Régulateur de la transcription	6927

HNRNPA1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	P09651	Noyau	autre	3178
HNRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	P22626	Noyau	autre	3181
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	--	Noyau	autre	3183
HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	P31943	Noyau	autre	3187
HOMER1	homer homolog 1 (Drosophila)	Q86YM7	Plasma Membrane	autre	9456
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	--	Plasma Membrane	Enzyme	3265
HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	P37059	Cytoplasme	Enzyme	3294
HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	P17066	Inconnu	autre	3310
HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	P04792	Cytoplasme	autre	3315
IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast	--	Espace extracellulaire	cytokine	3456
IFNG	interferon, gamma	--	Espace extracellulaire	cytokine	3458
IL8	interleukin 8	--	Espace extracellulaire	cytokine	3576
IL1A	interleukin 1, alpha	--	Espace extracellulaire	cytokine	3552
INHBA	inhibin, beta A	--	Espace extracellulaire	growth factor	3624
ITGAM	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	--	Plasma Membrane	autre	3684
JUN	jun oncogene	--	Noyau	Régulateur de la transcription	3725
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	--	Cytoplasme	Enzyme	3845
LASP1	LIM and SH3 protein 1	Q14847	Cytoplasme	Transporteur	3927
LMNA	lamin A/C	P02545	Noyau	autre	4000
MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	--	Cytoplasme	kinase	4214
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	--	Cytoplasme	kinase	1432
MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	P40926	Cytoplasme	Enzyme	4191
MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	--	Noyau	Régulateur de la transcription	8085
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	--	Noyau	Régulateur de la transcription	4609
NME1	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	--	Noyau	kinase	4830
NONO	non-POU domain containing, octamer-binding	Q15233	Noyau	autre	4841
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	--	Plasma Membrane	Régulateur de la transcription	4851
P4HA1	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	P13674	Cytoplasme	Enzyme	5033
P4HA2	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II	O15460	Cytoplasme	Enzyme	8974
PABPC1	poly(A) binding protein, Cytoplasmic 1	--	Cytoplasme	translation regulator	26986
PABPN1	poly(A) binding protein, nuclear 1	--	Noyau	autre	8106
PDIA3	protein disulfide isomerase family A, member 3	P30101	Cytoplasme	peptidase	2923
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)	--	Noyau	autre	5378
PIIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	P23284	Cytoplasme	Enzyme	5479
PSMF1	proteasome (prosome, macropain) inhibitor subunit 1 (PI31)	Q92530	Cytoplasme	autre	9491
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	--	Cytoplasme	kinase	5747
PXN	paxillin	--	Cytoplasme	autre	5829

RBBP5	retinoblastoma binding protein 5	--	Noyau	autre	5929
SERPINH1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	P50454	Espace extracellulaire	autre	871
SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	--	Noyau	autre	6421
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	P04179	Cytoplasme	Enzyme	6648
TAF6	TAF6 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 80kDa	--	Noyau	Régulateur de la transcription	6878
TAGLN	transgelin	Q01995	Cytoplasme	autre	6876
TAP1	Transporteur 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	--	Cytoplasme	Transporteur	6890
TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	--	Cytoplasme	Transporteur	6892
TBP	TATA box binding protein	--	Noyau	Régulateur de la transcription	6908
TCP1	t-complex 1	P17987	Cytoplasme	autre	6950
TERT	telomerase reverse transcriptase	--	Noyau	Enzyme	7015
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	--	Espace extracellulaire	growth factor	7040
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	--	Espace extracellulaire	cytokine	7124
TNPO1	transportin 1	--	Noyau	Transporteur	3842
TP53	tumor protein p53	--	Noyau	Régulateur de la transcription	7157
TPI1	triosephosphate isomerase 1	P60174	Cytoplasme	Enzyme	7167
TUFM	Tu translation elongation factor, mitochondrial	P49411	Cytoplasme	translation regulator	7284
USF1	upstream transcription factor 1	--	Noyau	Régulateur de la transcription	7391
USF2	upstream transcription factor 2, c-fos interacting	--	Noyau	Régulateur de la transcription	7392
UTX	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome	--	Noyau	autre	7403
VCL	vinculin	P18206	Plasma Membrane	Enzyme	7414
ZNF224	zinc finger protein 224	--	Noyau	autre	7767

© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

ANNEXE 3 : Article de Master 2 Recherche

(Manuscrit soumis à PLoS One, ref 09-PONE-RA-12907)

Differential dependence on Beclin 1 for the regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL

Short title : Bcl-xL cytoprotective functions

Muriel PRIAULT^{1,2*}, Erika HUE^{3,4}, Fanny MARHUENDA^{3,4}, Paul PILET⁵, Lisa OLIVER^{3,4} and François M. VALLETTE^{3,4}.

Summary

Autophagy is described to be involved in homeostasis, development and disease, both as a survival and a death process. Its involvement in cell death proceeds from interrelationships with the apoptotic pathway. We focused on survival autophagy instead, and investigated its interplays with the apoptotic machinery. We found that Bcl-2 and Bcl-xL stimulated survival autophagy while Mcl-1 remained ineffective. Such pro-autophagic functions of Bcl-2 and Bcl-xL were independent of Bax and arose from their capacity to help the formation of larger yet functional autophagosomes. However, the two proteins appeared to operate through non-redundant mechanisms: Bcl-xL and Atg7 manipulation yielded identical phenotypes suggesting they could be components of the same signaling pathway; Bcl-xL wielded a tighter control than Bcl-2 over the regulation of autophagy, and more importantly, Bcl-xL acted independently of Beclin 1. Still an intact BH3-binding site was required for Bcl-xL to stimulate a fully functional autophagic pathway.

Should Bcl-2 and Bcl-xL stand at the crossroads between pro-survival and pro-death autophagy, this study introduces the new concept that the regulation of autophagy by the two proteins is adjusted according to its survival or death outcome.